

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12Q 1/68, B01L 3/00	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/49173 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 24. August 2000 (24.08.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/01201		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(22) Internationales Anmeldedatum: 14. Februar 2000 (14.02.00)		
(30) Prioritätsdaten: 199 06 277.3 15. Februar 1999 (15.02.99) DE		Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten außer US</i>): FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Leonrodstrasse 54, D-80636 München (DE).		
(72) Erfinder; und		
(75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): VITZTHUM, Frank [DE/DE]; Zeppelinstrasse 40, D-71157 Hildrizhausen (DE). BERNHAGEN, Jürgen [DE/DE]; Friedrich-Schaal-Strasse 6, D-72024 Tübingen (DE). BENTSIAN, Elkin [—/DE]; Kaiserstrasse 8, D-70599 Stuttgart (DE). BRUNNER, Herwig [DE/DE]; An der Betteleiche 6, D-70569 Stuttgart (DE). GEIGER, Georg [DE/DE]; Gabelsbergerstrasse 33, D-75175 Pforzheim (DE).		
(74) Anwälte: SCHRELL, Andreas usw.; Maybachstrasse 6A, D-70469 Stuttgart (DE).		

(54) Title: **METHOD AND SAMPLE SUPPORT SYSTEM FOR SEPARATING AND PROCESSING SUBSTANCES IN SITU**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN UND PROBENTRÄGERSYSTEM ZUR TRENNUNG UND ANREICHERUNG VON STOFFEN IN SITU**

(57) Abstract

This invention relates to a method and a device for separating substances into and from biological materials.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung für die Auf trennung von Stoffen aus oder in biologischen Materialien.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun			PT	Portugal		
CN	China	KR	Republik Korea	RO	Rumänien		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SG	Singapur		
EE	Estland	LR	Liberia				

Verfahren und Probenträgersystem zur Trennung und Anreicherung von Stoffen in situ

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und eine Vorrichtung zur selektiven Trennung und Anreicherung von Stoffen in situ.

Trennung, Isolation und Desintegration bilden bei den meisten Separations-Verfahren in Biologie und Medizin eine Einheit. Biologisches Material wird desintegriert, um im Folgenden einzelne Stoffe oder Stoffgruppen beziehungsweise Kompartimente anzureichern, zu separieren oder zu isolieren.

Die Isolierung von Stoffen aus den unterschiedlichsten biologischen Materialien wird seit langer Zeit praktiziert. Zur eindeutigen Charakterisierung ebenso wie zur Anwendung in unterschiedlichen Bereichen, wie beispielsweise der Pharmazie oder Medizin, ist in den meisten Fällen die chemisch einheitliche Verbindung, also der reine Stoff, Voraussetzung. Im gesamten life science Bereich stellen Trennmethoden daher eine der wichtigsten Grundlagen zur Identifizierung von Stoffen und deren Anwendung dar. Die Isolierung beziehungsweise Trennung stellt dabei häufig, je nach konkreter Isolierungsaufgabe, beispielsweise hinsichtlich der Reinheit des zu isolierenden Stoffes, ein Problem dar.

Die Isolierung, Trennung oder Desintegration von biologischem Material, zum Beispiel Organismen, Gewebe, biologischen Zellen, Organellen, Micellen, Viren etc., stellt in der Regel den ersten Schritt bei der Analyse oder Gewinnung von Zellinhaltsstoffen dar. Bei solchen Inhaltsstoffen kann es sich zum Beispiel um Nucleinsäuren, Proteine, Metabolite, Farbstoffe etc. handeln. Da die Qualität aller nachfolgenden Schritte von der Desintegration des biologischen Materials bestimmt wird, kommt der Desintegration eine Schlüsselstellung zu. Neue Desintegrationsmethoden sind daher für eine Vielzahl von Verfahren interessant und besitzen ein entsprechend großes Potential, um als Produkt gewinnbringend vermarktet zu werden. Desintegrationsverfahren sind, wie auch vorstehend für die Trennverfahren dargelegt, Voraussetzungen für die 'life science' Bereiche, beispielsweise 'genomics', 'proteomics' und viele andere. Verfahren zur Desintegration von biologischem Material sind nicht universell, sondern sehr spezifisch auf die jeweiligen Anforderungen ausgerichtet. Die bekannten Verfahren - mechanischen beziehungsweise nichtmechanischen Desintegrationsverfahren - sind toxisch, teuer, zeitaufwendig und arbeitsintensiv sowie auf bestimmte Applikationen beschränkt. Außerdem besteht ein hohes Risiko einer Querkontamination, die einen sehr großen Einfluss auf die Qualität aller nachfolgenden Prozessschritte ausübt, vor allem bei empfindlichen Nachweisverfahren, wie beispielsweise den PCR-basierten Nucleinsäurenachweismethoden. Des Weiteren ist bei den bekannten mechanischen Verfahren eine Standardisierung und Automatisierung erschwert

oder eine Kombination mit Trenn- und Isolationsverfahren kaum möglich.

Zu den gängigen Trenn- und Isolationsverfahren verfahren zählen die Filtration, die Zentrifugation, die Kristallisation, die Destillation, die Extraktion, die Elektrophorese, die Chromatographie und auf Magnetismus beruhende Verfahren.

Schließlich wird zwischen analytischen und präparativen Verfahren unterschieden. Analytische Methoden dienen dem Nachweis von bestimmten Stoffen in Gemischen, während präparative Verfahren zur Anreicherung oder Gewinnung größerer Mengen eines möglichst reinen Stoffes eingesetzt werden.

Der Einsatz gepulster, elektrischer Felder für Trennzwecke ist bisher nicht bekannt.

Bekannt ist vielmehr, im Rahmen der Elektroporation derartige Felder einzusetzen (Prausnitz, M.R. et al., in Biophysical Journal 66 (1994), 1522-1530, US-Patent 5,019,034, US-Patent 5,273,525, US-Patent 5,304,120, US-Patent 5,389,069, US-Patent 5,422,272). Bei der Elektroporation werden über den jeweiligen Behandlungszeitraum in der Regel ein bis maximal zehn elektrische Impulse (Impulszahl) eingesetzt. In Abhängigkeit der Pulsfrequenz liegt die Behandlungsdauer maximal im Sekundenbereich, wobei die Feldstärke der Impulse so gewählt ist, dass die kritische Spannung (V_c , gleich etwa 1 Volt) über der Membran der zur elektroporierenden Zelle überschritten wird (bei kugelförmigen Objekten gilt: $v = 3/2 E_0 r$ mit r gleich Zellradius). Die Elektropo-

ration wird im allgemeinen unter schonenden Bedingungen, das heißt beispielsweise bei Raumtemperatur, durchgeführt, wobei die maximal physiologisch akzeptable Temperatur des jeweiligen Zielorganismus oder der Zielzelle nicht überschritten oder unterschritten werden darf (US-Patent 5,466,587, US-Patent 5,545,130, US-Patent 5,547,467, US-Patent 5,749,847).

Ähnliche Bedingungen werden bei der Zellfusion eingesetzt, wobei auch hier im Vordergrund steht, möglichst schonende Bedingungen zu wählen, um eine hohe Erfolgsrate bei der angestrebten Fusion zu erreichen ("Electroporation and Electrofusion" in: Cell Biology, Plenum Press, New York und London (1989), Herausgeber: Neumann, E., Sowers, A.E. und Jordan, C.A.).

Schließlich wird für den Kompletaufschluss von biologischen Zellen ebenfalls in manchen Fällen mit gepulsten elektrischen Feldern gearbeitet, wobei die Zellinhaltstoffe unkontrolliert freigesetzt werden. Dabei werden im allgemeinen Impulszahlen von über 20000 eingesetzt, wobei die Feldstärke ebenso wie bei der Elektroporation üblicherweise über der kritischen Spannung (V_c) von 1 Volt über der Membran der aufzuschließenden Zelle liegt. Die eingesetzten Temperaturen für den Aufschluss der biologischen Zellen sind im allgemeinen recht hoch, das heißt liegen weit über den physiologisch geeigneten Temperaturen, da der Aspekt der Schonung der Zellen keine Rolle mehr spielt und, im Gegensatz dazu, der Aufschluss durch den Einsatz extremer Bedingungen beschleunigt und vervollständigt werden

soll (US-Patent 5,235,905, US-Patent 5,447,733, US-Patent 5,393,541).

Es ist bisher nicht bekannt, mittels der herkömmlichen Verfahren biologisches Material zu separieren, zu trennen, zu desintegrieren und Stoffe freizusetzen und unmittelbar anzureichern oder zu isolieren, beziehungsweise zu reinigen. Herkömmlichen Verfahren, insbesondere Trennverfahren, geht im allgemeinen eine zeitaufwendige und teure Probenvorbereitung nach dem Zellaufschluss oder der Aufbereitung, insbesondere der Separation und/oder Desintegration, des biologischen Materials voraus. So wird das biologische Material häufig zunächst homogenisiert und aufgeschlossen, um dann weiteren Verarbeitungsschritten und schließlich dem Trennverfahren zugeführt zu werden. Nur in Ausnahmefällen kann das Homogenat direkt einem Trennverfahren unterzogen werden. Üblicherweise wird das Homogenat jedoch anschließend zentrifugiert und der Überstand als Rohextrakt einem Trennverfahren unterzogen, wobei zuvor der pH-Wert, die Ionenstärke und andere Parameter eingestellt werden müssen.

Der Erfindung liegt also das technische Problem zugrunde, ein Verfahren zur Trennung und Desintegration von Stoffen aus und/oder an biologischen Materialien bereitzustellen, das eine zeitaufwendige und teuere Probenvorbereitung unnötig macht und in einem einzigen Arbeitsschritt zur selektiven Freisetzung und/oder Abtrennung des oder der erwünschten Stoffe vor Ort - das heißt *in situ* - führt; weiterhin soll das Verfahren eine universelle, standardisierte und damit automatisierte Trennung

beziehungsweise Desintegration von biologischem Material, zum Beispiel Organismen, Gewebe, Zellen, Organellen, Micellen, Viren etc., gekoppelt mit der Freisetzung der Inhaltstoffe, ermöglichen.

Die vorliegende Erfindung löst dieses Problem, indem ein Verfahren zur selektiven Auftrennung von einem oder mehreren Stoffen aus einem in einem flüssigen Medium vorhandenen Stoffgemisch *in situ* mittels einer stationären und einer mobilen Phase bereitgestellt wird, wobei die stationäre Phase Bestandteil eines in dem flüssigen Medium befindlichen biologischen Materials und die mobile Phase das flüssige Medium ist und wobei das in dem flüssigen Medium befindliche biologische Material gepulsten elektrischen Feldern mit einer Feldstärke bis 200 V/cm ausgesetzt wird. Das aufzutrennende Stoffgemisch kann vor der erfindungsgemäßen Abtrennung, Desintegration, Isolierung oder Anreicherung in dem oder außerhalb des biologischen Materials vorhanden sein, oder auch in beidem. Das heißt, das Stoffgemisch kann direkt in dem flüssigen Medium oder eingeschlossen in dem biologischen Material im flüssigen Medium vorhanden sein. In bevorzugter Weise werden dabei, das heißt während und/oder nach der Behandlung mit den gepulsten, elektrischen Feldern ein oder mehrere erwünschte Stoffe aus dem biologischen Material freigesetzt, im flüssigen Medium angereichert und können dann vom biologischen Material mittels herkömmlicher Verfahren wie beispielsweise Zentrifugation oder Filtration von anderen, unerwünschten Stoffen und/oder dem biologischen Material abgetrennt werden. In einer weiteren bevorzugten, alternativen Ausführungsform der Er-

findung werden ein oder mehrere Stoffe im biologischen Material angereichert, damit dem flüssigen Medium außerhalb des biologischen Materials entzogen und anschließend das flüssige Medium außerhalb des biologischen Materials von dem biologischen Material abgetrennt, beispielsweise durch Zentrifugation oder Filtration.

Die Erfindung sieht in bevorzugter Ausführungsform also vor, dass direkt *in situ* mit dem biologischen Material eine Reinigung von einem oder mehreren Stoffen durchgeführt wird, wobei der oder die Stoffe in einem einzigen Schritt *in situ* freigesetzt und von anderen unerwünschten Stoffen getrennt werden. Die vorliegende Verfahrensweise vereinigt in bevorzugter Ausführungsform also die Schritte des Zellaufschlusses und der Stoffisolierung. Dabei dient das biologische Material, insbesondere dessen feste Bestandteile wie Zellskelett und Membranen, als eine Art stationäre Phase, während das flüssige Medium sowohl innerhalb als auch außerhalb des biologischen Materials als die mobile Phase aufgefasst werden kann. Das Verfahren zeichnet sich durch eine außergewöhnliche Einfachheit und Schnelligkeit aus, wobei eine zeitaufwendige mit einem hohen Materialbedarf verbundene Probenvorbereitung vor dem eigentlichen Trennschritt ebenso wenig wie ein Zellaufschluss nicht mehr notwendig sind. In Abhängigkeit des biologischen Materials können verschiedene Arten von Wechselwirkungen zur Trennung oder Anreicherung von Stoffen gleichzeitig ausgenutzt werden.

Das Verfahren ist ein Verfahren zur Separation, Isolation und/oder Desintegration von biologischem

Material in einem elektrischen Feld mit einer Feldstärke bis 200 V/cm. Das Verfahren kann insbesondere zum Zellaufschluss mit geringem Zeit- und Materialaufwand genutzt werden.

Das Verfahren ist universell einsetzbar und kann beispielsweise zur Abtrennung pharmakologisch interessanter Proteine oder zur Bestimmung multipler Gleichgewichte zwischen verschiedenen Stoffen in biologischen Systemen verwendet werden.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter dem Begriff biologisches Material von ein- oder zweischichtig aufgebauten Lipid- oder Lipoproteinschichten umhüllte räumliche Einheiten, also Kompartimente, wie Zellen, insbesondere menschliche, tierische, pflanzliche, Hefe- oder bakterielle Zellen, Zellaggregate, Reste oder Teile davon, Zellkompartimente wie Endoplasmatisches Reticulum, Plastiden, Mitochondrien oder Zellkerne, fusionierte oder in Teilung befindliche Zellen, künstliche Zellsysteme, Liposomen oder andere Mehrkomponentensysteme natürlichen oder synthetischen Ursprungs verstanden. Das biologische Material weist einen festen Bestandteil, zum Beispiel Zellskelett und Membranen, auch als stationäre Phase bezeichnet, und einen flüssigen Bestandteil, zum Beispiel cytoplasmatische Flüssigkeit, auf.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter dem Auftrennen eines oder mehrerer Stoffe das, vorzugsweise im wesentlichen Osmose- oder Diffusions-getriebene, gezielte Verändern von Konzentrationen eines oder mehrerer Stoffe in und außer-

halb des biologischen Materials, insbesondere das Separieren eines oder mehrerer Stoffe von anderen Stoffen, verstanden, wobei der eine oder die mehreren Stoffe aus einer Auswahl ebenfalls in dem flüssigen Medium vorhandener Stoffe, also einem Stoffgemisch, selektiert wird/werden. Durch das anliegende elektrische Feld können auch elektrophoretische Effekte als Antriebskraft für eine An- oder Abreicherung eines Stoffes dienen, beziehungsweise ausgenutzt werden.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter dem oder den aufzutrennenden Stoffen sämtliche, mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens auftrennbaren Stoffe verstanden, insbesondere Nucleinsäuren wie DNA oder RNA, in zirkulärer oder linearer Form, Proteine oder Peptide, auch in derivatisierter Form wie Glycoproteine, oder Kohlenhydrate, auch in derivatisierter Form wie Proteoglycane. Selbstverständlich können auch weitere Stoffe, seien sie natürlichen oder synthetischen Ursprungs aufgetrennt werden, wie Farbstoffe, Metaboliten, Naturstoffe, synthetische Makromoleküle und ähnliches. Der Begriff Stoff erfasst zum Beispiel nicht das Lösungsmittel, zum Beispiel Wasser.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter Anreichern eine Konzentrationserhöhung und Entreichern eine Konzentrationsverminderung verstanden.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter Desintegration ein Prozess verstanden, der den Ordnungszustand von biologischem Material modi-

fiziert oder die Modifizierung initiiert oder begleitet. Eine Zelle, insbesondere eine ohne Defekte, weist einen hohen Ordnungszustand auf, der beispielsweise durch Lysevorgänge an der Zellmembran verändert werden kann, indem Kompartimente der Zelle in die sie umgebende Lösung diffundieren. Im Sinne der Erfindung kann ein Verfahren zur Trennung, insbesondere zur selektiven Trennung, und/oder Anreicherung auch ein desintegrierendes Verfahren sein.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter flüssigem Medium eine vorzugsweise wässrige Lösung, Suspension oder Emulsion verstanden. Das flüssige Medium kann innerhalb des biologischen Materials in seiner Zusammensetzung von der Zusammensetzung außerhalb des biologischen Materials abweichen, beispielsweise innerhalb einer Zelle als Plasma und außerhalb der Zelle als physiologische Kochsalzlösung ausgeführt sein.

Die vorliegende Erfindung basiert unter anderem auf der Verwendung gepulster elektrischer Felder zur Behandlung von biologischem Material, wobei abhängig vom biologischen Material selbst, von Impulszahl, Impulsform, Behandlungsdauer und Temperatur die erzeugte Potentialdifferenz über der Membran des biologischen Materials vorzugsweise unterhalb der kritischen Spannung V_c liegt, so dass permanente oder transiente Poren in der Membran mit verschiedenen Durchmessern gebildet werden. Erfindungsgemäß ist es selbstverständlich auch möglich, Potentialdifferenzen über der Membran des biologischen Materials vorzusehen, die oberhalb der kriti-

schen Spannung V_c liegen. Durch die gebildeten Poren können extrazelluläre Stoffe in das biologische Material, insbesondere die Zelle, gelangen, wobei umgekehrt intrazelluläre Stoffe freigesetzt werden. Die Freisetzung beziehungsweise Aufnahme der Stoffe hängt von der Stärke und Art der Wechselwirkungen zwischen diesen Stoffen und zwischen den Stoffen und dem biologischen Material ab, der Lebensdauer sowie dem Durchmesser der Poren. Das biologische Material inklusiv der gegebenenfalls vorhandenen intrazellulären Matrix der vorhandenen Membranen und Zellwände, zum Beispiel Tubuline, etc. als "Zellskelett" ist an der Trennung beteiligt.

Die Erfindung sieht in einer bevorzugten Ausführungsform ein Verfahren zu einer chromatographieartigen selektiven Auftrennung von Stoffen *in situ* mittels einer stationären und einer mobilen Phase vor, wobei die stationäre Phase Bestandteil des biologischen Materials und die mobile Phase ein flüssiges Medium ist und wobei das in dem flüssigen Medium befindliche biologische Material gepulsten elektrischen Feldern mit Feldstärken bis 200 V/cm ausgesetzt wird und der oder die interessierenden Stoffe aus dem biologischen Material freigesetzt, im flüssigen Medium außerhalb des biologischen Materials angereichert und von dem biologischen Material abgetrennt werden. Die Erfindung sieht also in vorteilhafter Weise vor, dass *in situ*, das heißt vor Ort, also im und am die interessierenden Stoffe enthaltenen biologischen Material die Anreicherung oder Trennung erfolgt, ohne dass das biologische Material vor der Trennung oder Anreicherung aufgeschlossen werden muss. Zur Abtrennung können erfin-

dungsgemäß Zentrifugationsverfahren eingesetzt werden, die den oder die Stoffe von dem biologischen Material abtrennen können. Alternativ kann erfundungsgemäß auch vorgesehen sein, die Abtrennung des biologischen Materials von dem außerhalb des biologischen Materials vorhandenen flüssigen Mediums durch Filtration, Kristallisation, Extraktion, Elektrophorese, Chromatographie oder mittels ähnlicher Verfahren durchzuführen.

Die Durchführung des erfundungsgemäßen in situ-Trennverfahrens setzt für jede durchzuführende Isolieraufgabe die Optimierung der verschiedenen, die Trennleistung beeinflussender Parameter, wie die Feldstärke, die Impulszahl, die Impulsform, die Behandlungsdauer, die Temperatur, die Lösung, die Art des biologischen Materials etc. voraus.

Die Erfindung sieht in einer bevorzugten Ausführungsform vor, biologisches Material in einem Probenträgersystem zu desintegrieren, wobei das Probenträgersystem mindestens ein nicht-leitendes Element sowie mindestens zwei leitende Elemente umfasst, wobei an die leitenden Elemente eine Spannung angelegt wird und das biologische Material in einem elektrischen Feld mit einer Feldstärke bis 200 V/cm, insbesondere in einem Bereich von 5 bis 50 V/cm, ausgesetzt wird.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das auf das biologische Material einwirkende elektrische Feld homogen oder inhomogen. Vorzugsweise findet die Desintegration oder Tren-

nung der Organismen, Zellen oder Kompartimente in einem inhomogenen elektrischen Feld statt.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist die elektrische Feldliniendichte lokal erhöht. Die Desintegration oder Trennung, insbesondere selektive Trennung von biologischem Material findet vorteilhafterweise in einem inhomogenen elektrischen Feld statt, bei dem beispielsweise lokal die elektrische Feldliniendichte erhöht sein kann.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist es vorteilhaft, wenn die Anzahl der elektrischen Impulse über 10 liegt. Die Impulszahl kann durch das Produkt von Behandlungsdauer und Frequenz bestimmt werden. In Abhängigkeit der zu behandelnden Probe kann die Behandlungsdauer zwischen wenigen Sekunden und einigen Stunden betragen. Die verwendeten Frequenzen sollten hierbei zwischen einigen mHz und mehreren GHz liegen. Durch die gewählte Frequenz kann die maximale Impulsdauer entsprechend eingeschränkt werden. Die Impulsdauer kann einige Nanosekunden betragen, aber mit Vorteil auch im Minutenbereich liegen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung können die verwendeten gepulsten elektrischen Felder verschiedene Impulsformen aufweisen. Beispielsweise können exponentielle oder sinusförmige Impulsformen wie auch Rechtecksimpulse und/oder Dreiecksimpulse eingesetzt werden. Vorteilhaft ist es weiterhin, dass die Spannung des einzelnen Impulses in sich, beispielsweise sinusförmig, schwankt. Zweckmäßigerweise können bei der

Verwendung von Gleichspannungsimpulsen die Impulse ständig oder in Zeitintervallen umgepolt werden, so dass Wechselspannungs-Impulse appliziert werden können. Mit Vorteil ist auch eine Überlagerung von Gleich- und Wechselspannung möglich, um eine optimale Anreicherung, Trennung und/oder Desintegration zu erreichen. Es ist beispielsweise auch möglich, verschiedene Impulsformen und/oder Impulsintensitäten, das heißt Spannungsstärken und Impulsdauer variabel zu kombinieren; die Impulsdauer wird bei exponentiellen Impulsformen durch die Zeitkonstante (τ) ausgedrückt: $\tau = CR$ (C: Kondensatorkapazität, R: Widerstand).

In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung kann mit der entsprechenden Vorrichtung beispielsweise auch Drehstrom, das heißt Dreiphasendrehstrom, verwendet werden. Somit können beispielsweise sinusförmige Wechselspannungen mit einer Phasendifferenz von 120° , beziehungsweise 240° erzeugt werden.

Die Erfindung sieht dabei in einer bevorzugten Ausführungsform vor, Impulszahlen, das heißt Impulse pro Behandlungsdauer von mindestens 15, vorzugsweise von 15 bis 19000, insbesondere von 5000 bis 12000, einzusetzen. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform liegt die Feldstärke der Impulse weit unterhalb der kritischen Spannung V_c , die über der Membran oder Zellwand des biologischen Materials, zum Beispiel der Zelle oder des Liposoms, liegt. Erfindungsgemäß kann jedoch auch eine Feldstärke der Impulse vorgesehen sein, die oberhalb der kritischen Spannung V_c liegt, die über der

Membran oder Zellwand des biologischen Materials anliegt. Bevorzugt liegt die Feldstärke der Impulse bei 0 bis 200 V/cm, 0,001 bis 200 V/cm, 0,01 bis 200 V/cm, 20 bis 60 V/cm und insbesondere bei 30 bis 50 V/cm.

Erfindungsgemäß ist es in bevorzugter Ausführungsform möglich, auf einen Impuls hoher elektrischer Feldstärke einen zweiten Impuls geringerer Feldstärke folgen zu lassen, um so elektrophoretische Effekte zu unterstützen. Vorteilhaftweise können die Impulse mittels Gleichspannung überlagert werden.

Die Erfindung sieht in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform vor, die chromatographische Auftrennung bei Temperaturen zwischen -30 und +90°C, insbesondere 50 bis 55°C, durchzuführen. Insbesondere werden Temperaturen bevorzugt, die bei den gegebenen Rahmenbedingungen unterhalb der zu einem Zellaufschluss führenden Temperaturen und oberhalb beziehungsweise unterhalb der physiologischen, das heißt natürlicherweise vorliegenden Temperaturen des biologischen Materials liegen.

Vorteilhaftweise sieht die Erfindung in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform vor, die Desintegration bei Temperaturen zwischen 0 und 100°C, insbesondere zwischen 20 bis 80°C, durchzuführen.

Die Erfindung sieht in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform vor, dass die Behandlungsdauer, innerhalb derer die Auftrennung durch den Einsatz gepulster, elektrischer Felder durchgeführt wird, we-

nige Sekunden, zum Beispiel 2 bis 6 Sekunden, bis Stunden, zum Beispiel 3 bis 5 Stunden, beträgt.

Die Erfindung sieht in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform vor, dass die Frequenz der Impulse 0,01 Hz bis 40 GHz beträgt.

Schließlich sieht die Erfindung in einer weiteren bevorzugten Ausführungsform vor, dass die Impulsdauer 25 ps bis 50 min, insbesondere 15 μ s beträgt.

Bei der Elektroporation und Elektrofusion, gegebenenfalls in Kombination mit Dielektrophorese, werden üblicherweise hypoosmolare Medien verwendet, deren Leitfähigkeit möglichst niedrig ist. Dadurch werden elektrolytische Effekte, die Veränderung des pH-Wertes und die Freisetzung cytotoxischer Ionen aus den Elektroden minimiert. Da die Erhaltung der Vitalität der Zellen bei diesen Verfahren im Vordergrund steht ist die Zusammensetzung des Mediums kritisch. Ein weiterer Grund für die Verwendung derartiger Medien bei den aufgeführten Verfahren ist die Form der Zellen in hypoosmolaren Lösungen; sie runden sich ab. Somit wird die Berechnung der einzusetzenden Feldstärke erleichtert, die in der Regel bei kugelförmigen Objekten niedriger ist, um die kritische Spannung V_c zu erreichen. Außerdem werden bei den Verfahren überwiegend Medien verwendet, die optimale Kaliumkonzentrationen enthalten, damit die Vitalität der behandelten Zellen gewährleistet ist. Neben der Osmolarität der Medien und dem Vorhandensein bestimmter Ionen ist die Leitfähigkeit entscheidend. Bei der Elektroporation, Elektrofusion und Dielektrophorese ist diese in der

Regel gering. Im allgemeinen können nur so die Feldstärken erreicht werden, die nötig sind, um die für diese Verfahren erforderliche kritische Spannung V_c zu erzielen.

Da bei dem erfindungsgemäßen in situ-Trennverfahren nicht die Vitalität der Zellen im Vordergrund steht, werden hier vorzugsweise isoosmolare Medien mit gegenüber den bei der Elektroporation, Elektrofusion und Dielektrophorese üblicherweise verwendeten Leitfähigkeiten hohen Leitfähigkeiten eingesetzt. Es können natürlich auch hypo- oder hyperosmolare Medien mit vergleichsweise niedrigen oder hohen Leitfähigkeiten eingesetzt werden. Dadurch entfällt bei dem in situ-Trennverfahren das aufwendige "Umpuffern" der Proben. Das biologische Material kann direkt als "Rohmaterial" eingesetzt werden. Die Leitfähigkeit des Mediums bei der erfindungsgemäßen Verfahrensweise, also dem in situ-Trennverfahren kann vorzugsweise von 1 $\mu\text{S}/\text{cm}$ bis 2 S/cm , insbesondere von 5 bis 20 mS/cm betragen.

Pharmakologisch relevante, niedermolekulare Proteine wie der in *E. coli* clonierte und exprimierte humane Makrophagen Migration Inhibitory Factor (huMIF) mit einer relativen Molekulmasse von ca. 12,3 kDa können über das erfindungsgemäße in-situ-Trennverfahren aus entsprechenden Zellsuspensionen gereinigt werden. Das erfindungsgemäße in-situ-Trennverfahren kann auch im Bereich von Bioreaktoren eingesetzt werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann auch zur Bestimmung von Bindungsgleichgewichten verwendet wer-

den. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist es möglich, in Liposomen oder anderem biologischen Material Poren mit einer für das jeweilige Gleichgewicht optimal angepassten Lebensdauer und Größe zu induzieren. Dies bietet die Möglichkeit, die Prinzipien verschiedener Verfahren zur Bestimmung von Bindungsgleichgewichten mittels eines einzigen Verfahrens, nämlich des vorliegenden erfindungsgemäßen Verfahrens, zu nutzen. Erfindungsgemäß können auch mit Liganden gefüllte Liposomen eingesetzt werden, wobei nach entsprechender Permeabilisierung dieser Liposomen die Liganden bis zur Einstellung eines Gleichgewichtes frei vom intrazellulären Medium ins extrazelluläre Medium diffundieren können. Erfindungsgemäß kann vorgesehen sein, dass sich im extrazellulären Medium Makromoleküle, an das die Liganden binden können, befinden, so dass der Anteil der gebundenen Liganden dem Gleichgewicht entzogen wird und Liganden aus dem intrazellulären Medium weiter nachströmen, bis die freien Anteile der Liganden in beiden Kammern ausgeglichen sind. Nach der Einstellung des Gleichgewichtes entspricht dann die Konzentration der Liganden im extrazellulären Medium der Konzentration des freien Liganden im Assoziationsgleichgewicht des intrazellulären Mediums. Somit können nach der Bestimmung der Ligandenkonzentration im intrazellulären und extrazellulären Medium die Konzentrationen des freien und des gebundenen Liganden bestimmt werden. Unter Konstanthaltung der Makromolekülkonzentration bei verschiedenen Ligandenkonzentration ist dann die Bestimmung von Bindungskonstanten möglich.

Erfindungsgemäß ist es auch möglich, das Makromolekül im intrazellulären Medium und den Liganden im extrazellulären Medium vorzusehen. Selbstverständlich können statt Liposomen auch biologische Zellen verwendet werden.

Erfindungsgemäß ist es also möglich, die Bindungseigenschaften zelleigener oder exprimierter zellfremder Makromoleküle bezüglich eines bestimmten Liganden *in situ* zu untersuchen.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung gepulster, elektrischer Felder zur selektiven Trennung von Stoffen *in situ*, wobei die Stoffe entweder in einem biologischen Material umgebenden flüssigen Medium oder innerhalb des biologischen Materials angereichert werden, wobei bei der Erzeugung der gepulsten, elektrischen Felder vorzugsweise Impulszahlen von mindestens 15, vorzugsweise von 15 bis 19000, insbesondere 5000 bis 12000, eingesetzt werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist vorgesehen, die zu behandelnden Proben auf Matrices, beispielsweise Membranen oder Vliese, aufzubringen. Die Matrices können entweder in direktem Kontakt zu den leitenden Elementen stehen oder beispielsweise über Flüssigkeitszonen von den leitenden Elementen getrennt sein.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist vorgesehen, dass die zu behandelnden Proben, insbesondere dotierte Matrices oder Flüssigkeiten, die das biologische Material beinhalten,

nicht in direktem Kontakt mit den leitenden Elementen, beispielsweise des Probenträgersystems, stehen. Der Kontakt kann vorteilhafterweise durch Luft unterbrochen werden, beispielsweise dadurch, dass leitende Elemente nicht in die Flüssigkeit eingetaucht werden und/oder durch eine Ummantelung leitender Elemente mit nicht leitenden Elementen. Um in den so präparierten Proben insbesondere Feldstärken von bis zu 200 V/cm zu erreichen, ist es vorteilhaft, an den leitenden Elementen gegebenenfalls höhere Spannungen, auch in Abhängigkeit des Abstandes der leitenden Elemente, einzusetzen. Da bei den elektrischen Trenn-, Desintegrations- beziehungsweise Anreicherungsverfahren vorzugsweise gepulste elektrische Felder mit sehr niedrigen Feldstärken eingesetzt werden können oder vorteilhafterweise kein direkter Kontakt der leitenden Elemente mit der Probe vorhanden sein muss, wird die Wahl des Lösungsmittels nicht eingeschränkt. Es ist beispielsweise möglich, biologisches Material auch in Lösungen mit hohen spezifischen Leitfähigkeiten aufzuschließen beziehungsweise anzureichern oder zu trennen, ohne dass es zu Funkenentladungen kommen kann. Dies eröffnet insbesondere die Möglichkeit, die elektrische Trennung, Anreicherung und/oder Desintegration mit chemischen Verfahren zu kombinieren.

In einer vorteilhaften Ausgestaltung der Erfindung ist vorgesehen, dass bestimmte Salze, beispielsweise chaotrope Salze sowie Detergenzien, Enzyme und andere vor oder während der elektrischen Trennung und/oder Desintegration eingesetzt werden können. Selbstverständlich ist es auch möglich, eine chemi-

sche Nachbehandlung der erhaltenen getrennten oder desintegrierten Proben beziehungsweise Suspensionen durchzuführen. Vorteilhafterweise kann die Kombination einer chemischen Trennung, Anreicherung und/oder Desintegration mit der durch elektrische Felder induzierten oder begleiteten Anreicherung, Trennung und/oder Desintegration nicht nur zu einer einfachen Addition der Effekte führen, sondern auch zu unerwarteten und neuen synergetischen Effekten.

Mit Vorteil können Chemikalien, die die spezifische Leitfähigkeit der extrazellulären Phase der Zellmembran und gegebenenfalls des Zellinneren verändern und/oder stabilisieren, eingesetzt werden. Dies wirkt sich vorteilhafterweise auf die Potentialdifferenz über die Zellmembran aus. Dadurch verändert sich beispielsweise die kritische Spannung über die Zellmembran, die notwendig ist, um Poren, diskrete Läsionen und/oder Rupturen in der Zellmembran zu generieren. Außerdem können entsprechende Chemikalien, die die Fluidität der Zellmembranen beeinflussen und/oder modifizieren, eingesetzt werden. Ähnlich wie bei einer Temperaturerhöhung die Fluidität der Zellmembran beeinflusst wird und sich auf den Wert der kritischen Zellmembranspannung auswirkt, so können Chemikalien vorteilhafterweise ebenfalls die Fluidität der Zellmembran, insbesondere die kritische Zellmembranspannung, beeinflussen. Somit können Chemikalien und Temperaturänderungen die Fluidität der Zellmembran beeinflussen, was sich auf den Wert der kritischen Zellspannung auswirkt. Die Chemikalien können gegebenenfalls auch additive, lytische Eigenschaften aufweisen. Des weiteren kann in vorteilhafter Weise durch den

Zusatz von Chemikalien der Abbau von Zellinhaltstoffen verhindert werden. So kann beispielsweise die chemische Inhibition von Nucleasen und/oder Proteasen bei der Gewinnung von Nucleinsäuren und/oder Proteinen durch einen elektrischen Zellaufschluss vorteilhaft sein. Aber auch andere Zellinhaltsstoffe, wie beispielsweise Metabolite, können so während und nach ihrer Freisetzung durch den elektrischen Zellaufschluss, insbesondere während der Trennung und/oder Desintegration, stabilisiert werden.

Die Erfindung betrifft auch eine Vorrichtung, die ein nicht-leitendes Element sowie mindestens zwei leitende Elemente, insbesondere Elektroden, umfasst. In einer besonderen Ausführungsform ist vorgesehen, dass das nicht-leitende Element als Aufnahmemittel ausgebildet ist und beispielsweise über eine Abdeckung leitende Elemente mit dem Aufnahmemittel so verbunden werden können, dass die Probe in dem Aufnahmemittel desintegriert werden kann. Es kann jedoch vorteilhafterweise auch vorgesehen sein, dass das Aufnahmemittel ein leitendes Element umfasst. Das leitende Elemente, kann ein nichtleitendes Element aufweisen, so dass eine Spannung aufgebaut werden kann, es ist jedoch auch möglich, dass das Aufnahmemittel nur ein erstes leitendes Element umfasst und das zweite leitende Element, in einer Abdeckung für das Aufnahmemittel so angebracht ist, dass es wirkverbindbar zu dem als Aufnahmemittel ausgebildeten ersten leitenden Element positioniert werden kann.

Die Erfindung betrifft auch eine Vorrichtung zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens, insbesondere ein Probenträgersystem oder eine in situ-Trennvorrichtung, wobei dieses als ein vorzugsweise im wesentlichen kastenförmiges, insbesondere quaderförmiges, Gehäuse mit einer Bodenplatte, einer Deckplatte, zwei Seitenwänden und zwei als Seitenwände ausgeführten Elektroden ausgeführt ist. Die Deckplatte weist zumindest eine Öffnung auf, wobei in der Deckplatte und gegebenenfalls in der Bodenplatte weitere Öffnungen vorgesehen sein können. Diese Öffnungen können jeweils mit einem Filter verschlossen sein, der einer Abtrennung des aufgetrennten Stoffes oder Stoffgemisches dient. Die Elektroden können aus Aluminium, Edelstahl, Kohle, Platin, Gold oder Silber bestehen oder diese allein oder in Kombination enthalten. Vorzugsweise umfasst das erfindungsgemäße Probenträgersystem auch einen Spannungsgenerator, insbesondere eine HVA-Apparatur ("high voltage apparatus"), einen Frequenzgenerator und einen Impulsgeber.

Um bei der elektrischen selektiven Trennung, Separation und/oder Desintegration einen hohen Proben-durchsatz zu ermöglichen, ist es vorteilhaft, Trennvorrichtungen zur Verfügung zu stellen, bei denen mehrere Proben auf einmal behandelt werden können. Dies kann beispielsweise durch verschiedene Formate, wie sie auch in bekannten Microtiterplattensystemen verwendet werden, vorteilhaft realisiert werden. Um elektrische Felder zu erzeugen, sind beispielsweise auch neue Arraysysteme vorteilhaft, die beispielsweise aus einem Probenträger und einer Abdeckung bestehen. Leitende und nicht lei-

tende Elemente können hierbei vorteilhafterweise durch unterschiedliche Anordnung von leitenden und nicht leitenden Elementen der Probenträger sowie der Abdeckungen aufeinander abgestimmt sein. Beispielsweise können bei den Abdeckungen zylindrische Metallstäbe, mit einer zusätzlichen leitenden Platte in der Abdeckung des Probenträgers oder am Ende des Metallstabes Verwendung finden. Die Metallstäbe können vorteilhafterweise an ihrem in die Probe ragenden Ende als Kugel ausgebildet sein. Mit Vorteil kann eine teilweise oder vollständige Isolierung der Metallstäbe beziehungsweise leitenden Elementen der Abdeckplatte der Trennvorrichtung und/oder der gesamten Trennvorrichtung und/oder des Probenträgers sinnvoll sein. Trennvorrichtungen für die selektive Trennung und Probenträger für die Desintegration können vorteilhafterweise für die Prozesse der Desintegration, Trennung und/oder Isolierung eingesetzt werden. Um elektrische Desintegrationsarrays mit anderen Verfahren kompatibel zu gestalten, ist es vorteilhaft, standardisierte Abmessungen zu verwenden. Es ist beispielsweise von Vorteil, ein solches elektrisches Desintegrationsarray oder beispielsweise einen einzelnen Probenträger auf die Abmessungen von probenträgerhaltigen bekannten PCR Geräten, Fluorimetern, Spektrofotometern und ähnlichen anzupassen. Hierbei ist es besonders vorteilhaft, transparente Bereiche, beispielsweise in den nicht leitenden Elementen, insbesondere den Bodenplatten, bereitzustellen.

Weitere vorteilhafte Ausgestaltungsformen der Erfindung ergeben sich aus den Unteransprüchen.

Die Erfindung wird anhand der nachstehenden Beispiele sowie der dazugehörenden Figuren näher erläutert.

Die Figuren zeigen:

Figur 1 schematisch das der Erfindung zugrundeliegende Prinzip,

Figur 2 eine in situ-Trennvorrichtung mit einer Öffnung in der Deckplatte im Längsschnitt,

Figur 3 eine in situ-Trennvorrichtung mit zwei getrennten Öffnungen in der Deckplatte im Längsschnitt,

Figur 4 eine in situ-Trennvorrichtung mit einer Öffnung in der Deckplatte und einer Öffnung in der Bodenplatte, in die ein Filter eingesetzt ist im Längsschnitt,

Figur 5 eine in situ-Trennvorrichtung mit zwei Öffnungen in der Deckplatte und einer Öffnung in der Bodenplatte im Längsschnitt, wobei eine Öffnung in der Deckplatte und die Öffnung in der Bodenplatte mit einem Filter versehen sind,

Figur 6 einen Querschnitt durch die in situ-Trennvorrichtung der Figuren 2 bis 5,

Figur 7 einen Querschnitt durch ein Probenträgersystem,

Figur 8 einen Querschnitt durch das Probenträgersystem mit einer Abdeckung,

Figur 9 einen Querschnitt durch das Probenträgersystem mit einer hydraulischen Abdichtung,

Figur 10 eine Draufsicht auf einen Chip für die Trennung und/oder Desintegration,

Figur 11 einen Längsschnitt durch Probenträgersysteme,

Figur 12 einen Querschnitt durch einzelne Probenträgersysteme,

Figur 13 einen Längsschnitt durch Probenträgersysteme, wobei ein Aufnahmemittel leitende Elemente umfasst,

Figur 14 einen Längsschnitt durch Abdeckungen für Aufnahmemittel, wobei diese leitende Elemente umfassen,

Figur 15 die Abhängigkeit der Anreicherung eines Stoffes von der Feldstärke,

Figuren 16 und 17 die Abhängigkeit der Anreicherung eines Stoffes von der Impulszahl,

- 27 -

Figur 18 die Abhängigkeit der Anreicherung eines Stoffes von der Behandlungsdauer und

Figur 19 die Abhängigkeit der Anreicherung eines Stoffes von der Trenntemperatur.

Die Figur 1 stellt in einer Prinzipskizze den Ablauf des erfindungsgemäßen Verfahrens dar. Dargestellt ist eine in situ-Trennvorrichtung 12 in zwei Zuständen, wobei sich die in der Figur 1 linke Kammer 12 im Ruhezustand befindet, während die in der Figur 1 rechte Trennvorrichtung 12 gepulsten elektrischen Feldern E ausgesetzt ist. In der in situ-Trennvorrichtung 12 befindet sich eine Zelle 7 in einem außerhalb der Zelle 7 befindlichen flüssigen Medium 5. Die Zelle 7 setzt sich zusammen aus der intrazellulären Matrix 9, dem innerhalb des biologischen Materials 7 befindlichen flüssigen Medium 10 sowie der Zellwand beziehungsweise Zellmembran 8. Die stationäre Phase des erfindungsgemäßen chromatographischen Systems wird also durch die Zellmembran 8 und die intrazelluläre Matrix 9 gebildet, während die mobile Phase aus dem innerhalb und außerhalb des biologischen Materials 7 befindlichen flüssigen Medium gebildet wird, wobei sich die Zusammensetzung des innerhalb des biologischen Materials befindlichen Medium von der des außerhalb befindlichen Medium durchaus unterscheiden kann. Innerhalb des biologischen Materials befinden sich im Ruhezustand vier verschiedene Stoffe S1, S2, S3 und S4, wobei S1 mit der Zellwand 8 fest verbunden ist, während S2, S3 und S4 innerhalb des biologischen Materials 7 frei vorliegen. Die dargestellte Größe der zu trennenden Stoffe S entspricht der Molekül-

größe der zu trennenden Stoffe. Dargestellt sind ferner auch die beiden Elektroden 11 der in situ-Trennvorrichtung 12.

Nachdem die Zellen 7 in einem geeigneten flüssigen Medium 5 in die in situ-Trennvorrichtung 12 überführt wurden, werden durch den Einfluss gepulster, elektrischer Felder E Poren 6 in der Zellmembran oder Zellwand 8 der Zellen 7 generiert (rechte Kammer). Die Feldstärke E wird dabei aus dem Quotienten aus angelegter Spannung und dem Abstand der Elektroden 11 in der in situ-Trennvorrichtung 12 bestimmt. Die Lebensdauer, Anzahl und Größe der Poren 6 hängt unter anderem von den Eigenschaften der biologischen Zelle 7, deren Größe, Form, Struktur, der Orientierung der Zelle 7 im elektrischen Feld, den gepulsten elektrischen Feldern selbst, das heißt der Feldstärke, der Impulszahl, der Behandlungsdauer der Impulsfrequenz, der Zeitkonstante, der Impulsdauer, der Impulsform, der Behandlungs-temperatur, der Zusammensetzung des flüssigen Mediums 5, insbesondere dem pH-Wert, der Ionenstärke, der Leitfähigkeit, der Ionenart, der Osmolarität, der Konzentration des biologischen Materials sowie gegebenenfalls zugesetzter additiver Detergenzien, Chaotrope, Komplexbildner oder organischer Lösungsmittel ab. Die chromatographische Trennleistung des erfindungsgemäßen Verfahrens selbst ist abhängig von den Eigenschaften und den daraus resultierenden Wechselwirkungen der zu trennenden Stoffe S1, S2, S3, S4 sowie der stationären und der mobilen Phase. Zudem ist die relative Bewegung von stationärer und mobiler Phase zueinander für die Trennleistung des erfindungsgemäßen Verfahrens verantwortlich.

Die Eigenschaften der zu trennenden Stoffe S1, S2, S3, S4 und der stationären und mobilen Phase bezüglich ihrer Fähigkeit, elektrostatische, hydrophobe, aromatische Wechselwirkungen und H-Brückenbindungen einzugehen, hängt von der Zusammensetzung des flüssigen Mediums 5 ab. Ebenso wirken sich die Behandlungstemperatur und die Eigenschaften des verwendeten elektrischen Feldes E aus. Die Größe der zu trennenden Stoffe S1 bis S4 ist in der Regel von diesen Faktoren unabhängig. Das erfindungsgemäße Verfahren setzt daher sämtliche Wechselwirkungen der gängigen chromatographischen Verfahren wie Gelpermeations-, Ionentauscher-, Affinitäts- und hydrophobe Interaktionschromatographie für die Trennung ein.

Von Bedeutung für die relative Bewegung von stationärer gegenüber mobiler Phase ist die Zusammensetzung des innerhalb des biologischen Materials 7 und des außerhalb des biologischen Materials 7 befindlichen flüssigen Mediums hinsichtlich osmotischer und Diffusions-kontrollierter Prozesse. Die Erfindung nutzt zudem zusätzlich elektrophoretische Effekte aus, die durch das Anlegen des elektrischen Feldes auftreten.

Die vorstehend beschriebenen Parameter beeinflussen die Geschwindigkeitskonstante k_+ des Übergangs der Stoffe S1 bis S4 vom biologischen Material 7 in den außerhalb des biologischen Materials 7 befindlichen Bereich des flüssigen Mediums 5. Das gleiche gilt für die Geschwindigkeitskonstante k_- des Übergangs der Stoffe S1 bis S4 vom außerhalb des biologischen

Materials 7 befindlichen flüssigen Medium 5 in den Bereich innerhalb des biologischen Materials 7. Ist die Lebensdauer der Poren 6 ausreichend, um einen Gleichgewichtszustand zuzulassen, ergibt sich aus dem Quotienten von k_+ und k_- eine Gleichgewichtsverteilung K . Liegt die Lebensdauer der Poren 6 unterhalb der Dauer der Einstellung des Gleichgewichtszustandes, liegt eine apparte Gleichgewichtskonstante K_{app} vor. Die erfindungsgemäße Verfahrensweise trifft auf beide Fallgestaltungen zu. Aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften der Stoffe S1 bis S4 ergeben sich verschiedene Verteilungskonstanten, so dass sich entsprechend dieser Verteilungskonstanten die Konzentrationsverhältnisse der Stoffe S1 bis S4 im Bereich innerhalb des biologischen Materials 7 und außerhalb des biologischen Materials 7 ändern. Erfindungsgemäß wird dies zur Trennung der Stoffe S1 bis S4 voneinander und von den restlichen, nicht dargestellten Stoffen sowie dem biologischen Material 7 ausgenutzt.

Der Figur 1 kann entnommen werden, dass bei den Stoffen S1, S3 und S4 im Vergleich zu Stoff S2 der Stoffaustausch über die induzierten Poren 6 in der Membran 8 nicht durch ihre Größe oder Form limitiert ist. Erfindungsgemäß werden der Poredurchmesser und deren Lebensdauer, welche durch die individuell einzustellenden Versuchsbedingungen definiert sind, als Molekularsieb ausgenutzt. Abgesehen von der Größe und Form unterscheiden sich Stoffe jedoch auch in anderen Eigenschaften, so dass mit der erfindungsgemäßen Verfahrensweise neben der Trennung nach Größe und Form andere Stoffeigenschaften ausgenutzt werden. So ist S1 mit der in-

- 31 -

trazellulären Matrix 9, beispielsweise am Zellskelett oder einer Organelle etc., assoziiert. Dieser Stoff kann daher nicht in den Bereich außerhalb des biologischen Materials 7 gelangen. Daraus folgt, dass k_1 , K_1 und damit die Konzentration außerhalb des biologischen Materials 7 $[S1]_e = 0$ gesetzt werden muss. S3 und S4 sind nicht mit der intrazellulären Matrix 9 assoziiert, liegen also löslich vor. Sie besitzen jedoch unterschiedliche Eigenschaften, beispielsweise bezüglich ihrer Polarisierbarkeit, Hydrophobizität, Aromatizität und Elektrostatik. Unter der Annahme folgender Verhältnisse der Verteilungskonstanten der Stoffe:

$$K_1 = 0 < K_2 < K_3 < K_4$$

ergibt sich bei jeweils der gleichen intrazellulären Ausgangskonzentration ($[S1]_{ia} = [S2]_{ia} = [S3]_{ia} = [S4]_{ia}$) und einer extrazellulären Ausgangskonzentration von jeweils Null, folgende intrazelluläre Konzentrationsverteilung nach der Behandlung:

$$[S1]_{ib} = [S1]_{ia} > [S2]_{ib} > [S3]_{ib} > [S4]_{ib}$$

und damit folgende extrazelluläre Konzentrationsverteilung:

$$[S1]_{eb} = 0 < [S2]_{eb} < [S3]_{eb} < [S4]_{eb}$$

Diese Konzentrationsänderungen werden erfindungsgemäß zur Abtrennung der Stoffe S2 bis S4 von S1, das heißt der selektiven Auftrennung, eingesetzt. Durch geeignete Wahl der Auftrennparameter können auch S2 bis S4 voneinander getrennt werden, ohne dass ein

Zellaufschluss und eine nachfolgende Reinigung notwendig sind.

Selbstverständlich ist es erfindungsgemäß mittels des vorstehend beschriebenen Verfahrens auch möglich, Stoffe aus dem flüssigen Medium außerhalb des biologischen Materials 7 voneinander zu trennen, indem selektiv eine Auswahl dieser Stoffe innerhalb des biologischen Materials 7 angereichert wird und somit eine Entreicherung dieses Stoffes oder der Stoffe und eine Anreicherung eines anderen Stoffes oder anderer Stoffe im außerhalb des biologischen Materials 7 befindlichen Medium 5 stattfindet.

Nach dem Einsatz des gepulsten elektrischen Feldes E wird das biologische Material 7, das heißt die stationäre Phase, zusammen mit dem in der stationären Phase befindlichen flüssigen Medium von dem außerhalb des biologischen Materials 7 befindlichen flüssigen Medium, beispielsweise mittels Zentrifugation oder Filtration, abgetrennt. Man erhält auf diese Weise ein von S1 abgetrenntes Gemisch aus S2, S3 und S4 außerhalb des biologischen Materials 7.

Die Figuren 2 bis 6 stellen Vorrichtungen zur Durchführung des erfindungsgemäßen in situ-Trennverfahrens dar, also Probenträgersysteme beziehungsweise in situ-Trennvorrichtungen 12. Die Figuren zeigen jeweils die Anordnung der beiden Elektroden 11 mit deren Anschlüssen 17 und den Elektrodenabstand 18. Die eingesetzten Spannungs-, Frequenz- und Impulsgeneratoren beziehungsweise -geber sind nicht dargestellt.

Der Elektrodenabstand 18 in der Trennvorrichtung 12 betrug 4 mm, das Elektrodenmaterial bestand aus Aluminium, die Kondensatorkapazität C betrug ca. 1,65 nF, der Widerstand der Behandlungszelle mit einer *E. coli*-Suspension und der eingesetzten HVA-Apparatur circa 2040 Ohm, die Zeitkonstante circa 3,4 μ s und die Impulsform war als exponentielle Abnahme ausgeführt.

Die verwendete exponentiell abnehmende Impulsform wurde durch eine Kondensatorenentladung erzeugt. Das elektrische Laden der Kondensatoren erfolgte hierbei mit einem niedrigeren Strom über einen längeren Zeitraum und mit entgegengesetzter, aber immer gleicher Stromrichtung, im Gegensatz zur elektrischen Entladung der Kondensatoren. Diese elektrischen Entladungen erzeugten Gleichspannungs-Impulse, die für das Trennverfahren ausschlaggebend waren. Die Impulsdauer wird bei exponentiell abnehmenden Impulsformen durch die Zeitkonstante (τ) ausgedrückt: $\tau = C R$ (C: Kondensatorkapazität; R: Widerstand).

Neben der exponentiell abnehmenden Impulsform können beispielsweise auch Rechteckimpulse, Dreieckimpulse oder sinusförmige Impulse eingesetzt werden. Es ist außerdem möglich, dass die Spannung eines Impulses in sich, beispielsweise sinusförmig, schwankt. Des Weiteren ist eine ständige Umpolung der aufeinanderfolgenden Impulse denkbar, so dass Wechselspannungs-Impulse appliziert werden.

Die Figur 2 zeigt eine in situ-Trennvorrichtung 12 mit einer Öffnung 15 in der Deckplatte 13, die zur

- 34 -

Probeneingabe und zur Probenentnahme dient. Die Trennvorrichtung 12 ist in der Form eines Quaders ausgebildet, wobei Bodenplatte 14 und Deckplatte 13 des Quaders als nicht-leitende Elemente und zwei Seitenwände als Elektroden 11 ausgeführt sind. Die zwei anderen Seitenwände 28 und 29 (Figur 6) sind aus nicht-leitendem Material. Die Probe wird demgemäß in die in situ-Trennvorrichtung 12 überführt und mit gepulsten elektrischen Feldern E behandelt. Bei dieser Vorgehensweise wird die Probe nach ihrer Behandlung zentrifugiert, um das außerhalb des biologischen Materials 7 befindliche Medium vom Medium in dem biologischen Material und dem biologischen Material selbst zu trennen. Erfindungsgemäß kann dies bei entsprechender Abmessung der in situ-Trennvorrichtung 12 direkt mit der in situ-Trennvorrichtung 12 selbst erfolgen. Der Überstand mit dem oder den gewünschten Stoffen wird dann abgenommen. Die Zentrifugation der Probe kann, nach der Behandlung mit gepulsten elektrischen Feldern E, auch separat erfolgen.

Die Figur 3 stellt im wesentlichen die gleiche Trennvorrichtung 12 wie in Figur 2 dargestellt dar, wobei jedoch in der Deckplatte 13 zwei Öffnungen 20 und 21 vorgesehen sind. Eine Öffnung 20 dient für die Probeneingabe, während die andere Öffnung 21 für die Probenentnahme genutzt wird. Dadurch wird ein kontinuierlicher Trennprozess möglich. Zudem kann jeweils eine der Öffnungen 20 oder 21 für einen gegebenenfalls erforderlichen Druckausgleich dienen.

Die Figur 4 stellt eine in situ-Trennvorrichtung 12 mit einer Öffnung 15 in der Deckplatte 13 und einer Öffnung 22 in der Bodenplatte 14 dar, wobei in der Öffnung 22 ein Filter 23 angeordnet ist. Die Probe wird durch die Öffnung 15 in der Deckplatte 13 in die Kammer 12 gegeben. Nach Einsatz des gepulsten elektrischen Feldes E wird das außerhalb des biologischen Materials 7 befindliche flüssige Medium über den Filter 23 und die Öffnung 22 in der Bodenplatte entfernt. Mit dem Filter 23 ist es möglich, die biologischen Zellen und somit das in diesen Zellen befindliche Medium zurückzuhalten, wobei eine kontinuierliche Trennvorrichtung ohne Zentrifugation und damit ein besonders schnelles und effizientes Auftrennverfahren möglich wird.

Die Figur 5 stellt im wesentlichen die bereits in Figur 4 dargestellte in situ-Trennvorrichtung 12 dar, wobei in der Deckplatte 13 jedoch zwei Öffnungen 24, 25 vorgesehen sind, wobei in der Öffnung 25 ein Filter 26 eingesetzt und die Öffnung 24 mit einem Deckel 50 verschließbar ist. Die dargestellte Trennvorrichtung 12 ermöglicht die kontinuierliche Zuführung extrazellulären Mediums über die Öffnung 25 mit dem Filter 26, wobei kein Probenmaterial in die Kammer 12 eingeführt wird. Die Probe kann vielmehr separat über die verschließbare Öffnung 24 zugegeben werden. Das flüssige Medium wird über einen Filter 23, der in der Öffnung 22 eingebracht ist, entfernt.

Die Figur 6 stellt einen Querschnitt durch die Kammern der Figuren 2 bis 5 dar, wobei der Abstand 27 zwischen den Seitenwänden 28 und 29 erkennbar ist.

Figur 7 zeigt eine als Probenträgersystem 31 ausgebildete in situ-Trennvorrichtung 12, die insbesondere für die Desintegration genutzt werden kann. Das Probenträgersystem umfasst mindestens zwei leitende Elemente, beispielsweise Elektroden 11, die parallel zueinander angeordnete Flächen ausbilden, die als eine Grundfläche, beispielsweise eine Bodenplatte 14, und eine Deckplatte 13 ausgeführt sind. Auf der Bodenplatte 14 befinden sich mindestens vier senkrecht angeordnete Seitenwände 28 und 29, die zusammen mit der Boden- und Deckplatte 13, 14 Kammern ausbilden, in denen das zu behandelnde Material gelagert werden kann. Der Elektrodenabstand 18 kann variiert werden, so dass die Deckplatte 13 die Probe verschließt oder zumindest mit der Probe in Kontakt kommt, wodurch eine elektrische Spannung zwischen der Deckplatte 13, die zusätzlich eine in das Probemedium ragende Ausbuchtung aufweisen kann, und der Bodenplatte 14 über die in flüssigem Medium vorliegende Probe erzeugt werden kann. Das Probenträgersystem 31 kann an die Gegebenheiten des zu untersuchenden biologischen Materials und an seine Abmessungen angepasst werden. Dies schließt Größenordnungen des Bereichs der Microsystemtechnik und Chiptechnologie als auch die derzeit gängigen Trägersysteme, die in Labors verwendet werden, ein. Das Probenträgersystem 31 ist - wie die in situ-Trennvorrichtung 12 - aus leitenden Elementen, den Elektroden 11 und nicht leitenden Elementen, wie beispielsweise den Seitenwänden 28 und 29 aufgebaut. Die Geometrie des Probenträgersystems kann so gewählt werden, dass gegebenenfalls sowohl homogene, als auch inhomogene elektrische Felder erzeugt

werden können. Die Applikation der elektrischen Felder erfolgt über Spannungs-, Frequenz- und Impulsgeneratoren, die entsprechend mit den leitenden Elementen, wie den Elektroden 11, der Probenträgersysteme 31, verbunden sind. In Anlehnung an Micropattensysteme, mit denen definierte Schichtdicken erzeugt werden können, ist es vorteilhaft, elektronische Desintegrationsarrays mit definierten Elektrodenabständen 18 so zu konzipieren, dass die Bildung von Blasen, welche das elektrische Feld beeinflussen können, verhindert werden kann. Hierbei ist es beispielsweise besonders vorteilhaft, konvexe Ausbuchtungen 33 in die leitenden Bereiche, wie die Elektroden 11, der Abdeckung 35 zu integrieren. Die Blasenbildung wird so weitestgehend vermieden, da beim Absenken der Abdeckung 35 das flüssige Medium 5 zur Seite verdrängt wird und seitlich runterlaufen kann. Voraussetzung hierfür ist beispielsweise die Verwendung von Probenvolumina, die größer als das Volumen des Probenträgernäpfchens 37 sind. Aufgrund der Oberflächenspannung bildet sich ein konvexer Meniskus aus, der dann blasenfrei verdrängt werden kann. Um bei diesem Vorgang eine Querkontamination zu verhindern, ist es beispielsweise vorteilhaft, Querkontaminationsbarrieren 39 so anzubringen, dass das flüssige Medium 5 beispielsweise beim Absenken der Abdeckung 35 nicht die benachbarten Probenträgernäpfchen 37 kontaminiieren kann.

Die Figur 8 zeigt ein Probenträgersystem 31, bei dem es möglich ist, auch mit Probenvolumina, die geringer als die Volumina des Probenträgernäpfchens 37 sind, definierte Elektrodenabstände 18 zu erhal-

ten. Die Blasenbildung kann verhindert werden, indem entsprechend geformte Ausbuchtungen 33 in die leitenden Bereiche der Abdeckung 35 integriert sind. Beispielsweise kann eine konvex geformte Spitze der Ausbuchtung 33 vorteilhaft sein, um die Bildung von Blasen zu vermindern, aber beispielsweise auch um bestimmte Formen elektrischer Felder zu erzeugen. Ausbuchtungen 41 mit konkav geformter Spitze sind vorzugsweise mit einem Kanal 43 versehen, damit mögliche Blasen entweichen können. Das Absenken der Abdeckung 35 führt dazu, dass die Probe in dem flüssigen Medium 5 durch die Ausbuchtungen 33 im Probenträgernäpfchen 37 seitlich verdrängt werden. Sollte es zum Überlaufen kommen, bieten die Querkontaminationsbarrieren 39 Schutz vor Querkontaminationen. Des Weiteren kann es vorteilhaft sein, Hohlräume 45 zur Thermostatisierung der Probenträgersysteme 31 zu integrieren. Die Hohlräume 45 können durch die Seitenwände 28 und 29 sowie durch die Elektroden 11 und eine Verschlussplatte 47 gebildet werden. Über entsprechende Anschlüsse können thermostatisierte Flüssigkeiten für definierte Behandlungstemperaturen sorgen. Es ist vorteilhafterweise ebenfalls möglich, nicht leitende oder vorzugsweise leitende Elemente direkt an eine Thermostatisierung zu koppeln.

Die Figur 9 zeigt ein Probenträgersystem 31 mit einem hydraulischen System 49. Um einen bestimmten Druck aufbauen zu können, der einen vorteilhaften Einfluss auf die elektrische Desintegration ausüben kann oder einen Druck aufzubauen, um beispielsweise in wässrigen Lösungen über 100°C zu arbeiten, ist es beispielsweise vorteilhaft, mit hydraulischen

Systemen 49 zu arbeiten, die die Abdeckung 35 auf die Probenträgernäpfchen 37 pressen. Es sind jedoch auch Schraubensysteme möglich, um das Probenträgersystem 31 abzudecken. Hierbei ist es vorteilhaft, wenn die Ausbuchtungen 33 der Abdeckung 35 exakt beziehungsweise nahezu exakt in die Probenträgernäpfchen 37 des Probenträgersystems 31 passen, so dass ein geschlossenes System entsteht. Hierbei sind beispielsweise Führungen 50 beispielsweise am oberen Rand des Probennäpfchenträgers 37 vorteilhaft. Statt einem externen hydraulischen oder schraubenartigen System, kann ein solches System auch direkt mit dem Probenträgersystem 31 oder mit der Abdeckung 35 kombiniert sein, wie das in Figur 9b dargestellt ist.

Figur 10 zeigt eine Chip 51 für die elektrische Desintegration oder Trennung von beispielsweise Zellen. Der Chip 51 kann so aufgebaut sein, dass in seine Grundfläche 53, die einige Quadratmillimeter aber auch Quadratzentimeter groß sein kann, eine Matrix von Aufschlusseinheiten 55 integriert sein kann.

Die Aufschlusseinheiten 55 können aus leitenden Elementen 57 und nicht leitenden Elementen 59 aufgebaut sein, in deren Zentrum ein Innenraum 61 für die Probenapplikation vorgesehen ist. Neben der eigentlichen elektrischen Desintegration und/oder Trennung von Zellen können auf den Chips 51 beispielsweise auch andere Verfahren, wie die Hybridisierung durchgeführt werden. Die Innenräume 61 bildenden leitenden Elemente 57 und nicht leitenden Elemente 59 müssen jedoch nicht als Matrix vorlie-

gen, sie können auch als einzelne Probenträgersysteme 31 konzipiert sein. Für die Desintegration ist es vorteilhaft, wenn die leitenden Elemente 57 durch nicht leitende Elemente 59 voneinander getrennt sind. Die leitenden Elemente 57 können jedoch auch an Positionen, wo sie in Kontakt mit dem flüssigen Medium 5 kommen, mit einer nicht leitenden Schicht überzogen sein. Die Abmessungen bezüglich der Höhe, sowie innere und äußere Abmessungen, sind variabel. Ebenfalls variabel sind die Ausdehnungen der leitenden Elemente 57 und der nicht leitenden Elemente 59. Neben kreisförmigen oder quadratischen Ausgestaltungen des horizontalen Querschnitts des Innenraums 61 des Probenträgersystems 31 sind selbstverständlich auch andere, beispielsweise ovale, rechteckige, dreieckige geometrische Querschnitte denkbar. Wobei kreisförmige beziehungsweise ovale oder ellipsoide Formen inhomogene elektrische Feldliniendichte lokal erhöht ist, daher sind diese Ausgestaltungen vorteilhaft einzusetzen. Wird Drehstrom zur Desintegration verwendet, müssen leitende Elemente 57 für drei Phasen vorhanden sein. Dies kann beispielsweise durch einen hexagonalen horizontalen Querschnitt mit leitenden und nicht leitenden Elementen erzielt werden. Bei den vorstehend genannten Ausführungsformen kann es vorteilhaft sein, Verschlussdeckel, beispielsweise Schnappverschlussdeckel zu integrieren, um das Risiko einer Querkontamination zusätzlich zu vermindern. Drehverschlüsse, die gegebenenfalls mit O-Ringen versehen sind, sind selbstverständlich ebenfalls vorteilhaft einsetzbar.

Figur 11 zeigt einen Längsschnitt durch Probenträgersysteme 31. Die Probenträgersysteme sind als behälterartige Aufnahmemittel 60 ausgestaltet. Figur 11a zeigt ein im Querschnitt rechteckig ausgebildetes Aufnahmemittel 60. Bei diesem Aufnahmemittel 60 sind die Seitenwände 28 und 29 nahezu parallel zueinander ausgerichtet oder als sich zum Boden hin verjüngender Kegelstumpf. Die Seitenwände 28 und 29 sind als leitende Elemente 57 ausgebildet. Die Verschlussplatte 61, die das Aufnahmemittel 60 nach unten abdichtet, ist als nicht-leitendes Element ausgebildet. Figur 11b zeigt ein Aufnahmemittel 60, welches eine Abdeckung 35 aufweist. Das Aufnahmemittel 60 zeigt eine sich zum Boden hin verjüngende kegelstumpfartige Form. Die Seitenwände 28 und 29 sind als leitende Elemente 57 ausgebildet. Die Verschlussplatte 61 besitzt im Querschnitt eine nahezu halbrunde Form. Die Abschlussplatte 61 ist als nicht leitendes Element 59 ausgebildet. Die Abdeckung 35 besitzt ein Scharnier 63, das Abdeckung 35 und Aufnahmemittel 60 verbindet. Die Abdeckung 35 weist weiterhin eine Abdichtung 65 auf, die als innerer umlaufender Wall auf der dem Aufnahmemittel zugewandten Seite ausgebildet ist. Der Durchmesser des umlaufenden Walls der Abdichtung 65 ist so gewählt, dass er die Innenflächen 67 des Aufnahmemittels 60 so verschließt, dass nur sehr wenig beziehungsweise kein Material entweichen kann. Da das Aufnahmemittel 60 kegelstumpfartig zum Boden hin verjüngend ausgebildet ist, muss die Abdichtung 65 - wie in Figur 11b dargestellt - einen ähnlichen Winkel aufweisen, um einen optimalen Verschluss zu gewährleisten.

Figur 12 zeigt einen Querschnitt durch einzelne Probenträgersysteme 31. Die Probenträgersysteme 31 weisen im Querschnitt leitende Elemente 57 und nicht-leitende Elemente 59 jeweils abwechselnd auf. Figur 12a zeigt ein Aufnahmemittel 60 mit einem runden Querschnitt. Die leitenden Elemente 57 und die nicht-leitenden Elemente 59 sind gegenüberliegend angeordnet. Figur 12b zeigt ein Probenträgersystem 31 mit einem quadratischen Querschnitt. Die jeweils gegenüberliegenden Seiten bilden jeweils die nicht-leitenden Elemente 60 und jeweils die leitenden Elemente 57. Figur 12c zeigt ein Probenträgersystem 31 mit einem hexagonalen horizontalen Querschnitt. Das dargestellte Probenträgersystem 31 eignet sich für die Verwendung von Drehstrom. Die leitenden Elemente 57 wechseln sich mit den nicht-leitenden Elementen 60 randumlaufend ab. Die Anordnung der leitenden Elemente 57 erfolgt dabei so, dass die Phase 1 69 sich gegenüberliegt. Die Phasen 2 71 und die Phasen 3 73 sind ebenfalls so angeordnet, dass sie gegenüberliegend ausgebildet sind. Die leitenden Elemente 57 können so ausgebildet sein, dass sie in die Wandung 75 eingelassen sind, oder die Wandung 75 bilden, wobei in der Wandung 75 nicht-leitende Elemente 69 alternierend angeordnet sind.

Figur 13 zeigt einen Längsschnitt durch Probenträgersysteme, wobei Aufnahmemittel leitende Elemente umfassen. Die Figuren 13a bis 13d zeigen Querschnitte von Probenträgersystemen 31, bei denen jeweils das gesamte Aufnahmemittel 60 als leitendes Element 57 ausgebildet ist beziehungsweise mindestens ein leitendes Element 57 pro Aufnahmemittel 60

aufweist. Die im Längsschnitt dargestellten Aufnahmemittel 60 können beispielsweise einen Ausschnitt aus einem modifizierten Mikroplattensystem darstellen. Die einzelnen Vertiefungen des Mikroplattensystems, beispielhaft in der Figur 13 als Aufnahmemittel 60 dargestellt, haben jeweils die Seitenwände 28 und 29 beziehungsweise die Verschlussplatten 61 als leitende Elemente 57 beziehungsweise nicht-leitende Elemente 59 ausgebildet. Figur 13a zeigt ein Probenträgersystem 31 aus mehreren aneinandergeordneten Aufnahmemitteln 60 und einer Abdeckung 35. Die Aufnahmemittel 60 sind durchgängig als leitendes Element 57 ausgebildet. In die Abdeckung 35, die als nicht-leitendes Element 59 ausgeführt ist, sind leitende Elemente 57 in Form von Stäben 77 so angebracht, dass die Stäbe 77 die Abdeckung 35 senkrecht durchdringen und in die Aufnahmemittel 60 hineinragen. Figur 13b zeigt einen vertikalen Querschnitt durch ein Probenträgersystem 31, bei dem das Aufnahmemittel 60 nicht durchgängig als leitendes Element 57 ausgebildet ist. Die Probenträger-näpfchen 37 sind durch nicht-leitende Stege 79 verbunden. Figur 13b zeigt weiterhin, dass die als leitende Elemente 57 ausgebildeten Probenträger-näpfchen 37 an der Innenseite mit einer Schicht 81 isoliert sein können. Diese Schicht 81 kann an den Innenwänden der Seitenwände 28 oder 29 beziehungsweise an der Verschlussplatte 61 auf der Seite angebracht sein, die in das Probenträgernäpfchen 37 weist. Die Ausbildung des leitenden Elementes 57 kann auch in Form einer leitenden Membran 83 erfolgen. Die leitende Membran 83 bildet den Abschluss des Aufnahmemittels 60 beispielsweise in Form der Verschlussplatte 61. Die Figur 13c zeigt Aufnahme-

mittel 60, die mit Ausnahme der Verschlussplatte 61 als nicht-leitende Elemente 59 ausgeführt sind; die Verschlussplatte 61 ist als leitendes Element 57 ausgebildet. Die Verschlussplatte 61 kann eben, konkav oder konvex angeordnet sein. Figur 13d zeigt ein Probenträgersystem 31, bei dem jeweils die Seitenwände 28, 29 die leitenden Elemente 57 bilden. Der Boden der jeweiligen Probennäpfchen 37 ist ebenso wie die Stege 79 als nicht-leitendes Element 59 ausgebildet; die Verschlussplatte 61 kann auch als nicht-leitende Membran 85 ausgeführt sein. Durch diese Form der Anordnung sind leitende Elemente 57 und nicht-leitende Elemente 59 jeweils abwechselnd in dem Probenträgersystem 31 positioniert. Eine in den Probenträgernäpfchen 37 befindliche biologische Probe könnte durch die als leitende Elemente 57 ausgebildeten Seitenwände 28, 29 desintegriert werden. Der dargestellte vertikale Querschnitt kann ein Ausschnitt aus einem modifizierten Microplattensystem sein.

Figur 14 zeigt einen Längsschnitt durch Abdeckungen 35, die leitende Elemente 57 umfassen. Die leitenden Elemente 57 sind jeweils senkrecht in die Abdeckung 35 eingebbracht. Die leitenden Elemente 57 sind hierbei als Stäbe 77 ausgebildet. Die Stäbe 77 durchdringen die Abdeckung 35 senkrecht. Es kann beispielsweise vorgesehen sein, dass die Abdeckungen 35 als Deckel für Microplatten zum Einsatz kommen oder für modifizierte Microplatten, wie sie in Figur 13 ausschnittsweise dargestellt sind. Die Stäbe 77, die als leitende Elemente 57 ausgeführt sind, werden jeweils in den Abdeckungen so angebracht, dass ihr längeres Ende in Richtung der mög-

lichen Aufnahmemittel 60 weist. Das in die Lösung ragende Ende der Stäbe 77 kann kugelförmig oder beispielsweise als T-Form ausgebildet sein. T-förmig heißt hierbei, dass an das in die Probe ragbare Ende des Stabes 77 beispielsweise im Winkel von 90° ein Querstab angebracht ist, der eine geringere Länge als der Stab 77 hat. Figur 14a zeigt den Ausschnitt aus einer Abdeckung 35, in die Stäbe 77 eingebracht sind. Die als zylindrische Metallstäbe ausgebildeten Stäbe 77 weisen in der Abdeckung 35 zusätzlich leitende Platten 87 auf. Die Stäbe 77 können in dem in die Probe weisenden Teil von einer Isolierung 89 umschlossen sein. Die Isolierung 89 ist hierbei so angebracht, dass sie die leitende Platte 87 ebenfalls auf der zu dem Aufnahmemittel 60 weisenden Seite isoliert ist. Figur 14b zeigt leitende Elemente 57, die über nicht-leitende Elemente 59 miteinander verbunden sind und Teil einer Abdeckung 35, beispielsweise für Aufnahmemittel 60, sein können. Die leitenden Elemente 57 sind als Stäbe 77, beispielsweise in Form von im Querschnitt runden Metallstäben, ausgebildet. Der horizontale Querschnitt dieser Metallstäbe kann jedoch auch rechteckig oder polygon sein. Die als Metallstäbe ausgebildeten Stäbe 77 weisen zu ihrem unteren, in Richtung der Aufnahmemittel 60 weisenden, Ende T-förmige Endigungen 91 auf. Figur 14c zeigt den in Abbildung 14b dargestellten Verbund aus leitenden Elementen 57 und nicht-leitenden Elementen 59, wobei die leitenden Elemente 57 zum Teil eine Isolierung 89 aufweisen. Die Isolierung 89 umschließt die Stäbe 77 so, dass auf der nach oben gerichteten Seite die Stäbe 77 aus der Isolierung 89 herausragen und in der nach unten gerichteten Seite die T-

formige Endigung 91 frei liegt, also nicht von einer Isolierung 89 umschlossen ist. Weiterhin weist der in Abbildung 14c dargestellte Verbund, beispielsweise als Teil einer Abdeckung 35, keine leitende Platte 57 auf. Abbildung 14c zeigt eine Abdeckung 35, in die Stäbe 77 und leitende Platten 87 eingelassen sind. Die beispielsweise als zylindrische Metallstäbe ausgebildeten Stäbe 77 weisen an ihrem unteren längeren Ende Kugeln 93 auf, das heißt, der in das Aufnahmemittel 60 ragende Teil der Stäbe 77 endet in einer kugelförmigen Ausbildung. Die Kugeln 93 können bei allen Stäben 77 den gleichen Durchmesser oder aber unterschiedliche Durchmesser aufweisen. Die in Figur 14 dargestellten Verbünde aus leitenden Elementen 57 und nicht-leitenden Elementen 59 können Teil einer Abdeckung 35 sein. Diese Abdeckung 35 kann beispielsweise im Stand der Technik bekannte Microplatten abdecken, wobei für die Desintegration pro Well mindestens zwei leitende Elemente 57 wirkverbunden sein müssen. Es ist jedoch auch möglich, dass mit den in Figur 14 dargestellten leitenden Elementen 57 und nicht-leitenden Elementen 59 sowie der leitenden Platte 87 Probenträgersystem 31, wie in Figur 13b, 13c oder 13d dargestellt, abgedeckt werden. Das Aufbringen der Abdeckung 35 auf ein Probenträgersystem 31 kann dabei so erfolgen, dass jeder einzelne in der Abdeckung 35 ausgebildete Stab 77 in ein einziges Aufnahmemittel 60, beispielsweise ein Probenträgernäpfchen 37, hineinragt. Probenträgernäpfchen 37 und leitende Elemente 47 wären in diesem Falle wirkverbindbar angeordnet. Es kann jedoch auch vorgesehen sein, die Abdeckplatte 35 mit dem in ihr angeordneten Stäben 77 so einzusetzen, dass

jeweils mehrere Stäbe 77 in ein und demselben Pro-
benträgernäpfchen 37 wirkverbindbar angeordnet
sind. Die Desintegration mittels elektrischer Span-
nung könnte hierbei zwischen den einzelnen Stäben
77 stattfinden.

Beispiel: DNA- und Proteinauf trennung in E. coli

In einer Trennvorrichtung 12 gemäß Figur 2 wurde
eine E. coli-Zellsuspension mit einer Zellkonzent-
ration zwischen ein- bis zehnmal 10^9 KBE/ml
(kolonienbildende Einheiten) E. coli-Stamm DH5 α
(mit dem pET11b High Copy Plasmid und MIF-Insert,
Macrophage Migration Inhibitory Factor) mit gepul-
sten elektrischen Feldern behandelt. Die E. coli-
Zellen befanden sich in PBS/EDTA-Lösung mit einem
pH-Wert von 7,4.

Ein Aliquot der Zellsuspension von 300 μ l wurde in
die in situ-Trennvorrichtung 12 pipettiert. Als Ne-
gativkontrolle wurde das gleiche Volumen der Zell-
suspension in einem Reaktionsgefäß unter entspre-
chenden Bedingungen inkubiert. Nach der Behandlung
mit den gepulsten elektrischen Feldern (vergleiche
nachstehende Parametervariationen) wurde die Tempe-
ratur der Zellsuspension bestimmt. Anschließend
wurde die behandelte Zellsuspension gemischt und
aus der Probenkammer abpipettiert. Daran schloss
sich eine Zentrifugation von einer Minute mit 13000
rpm (16060 g) bei 4°C an, wobei sowohl die mit ge-
pulsten elektrischen Feldern als auch die Negativ-
kontrolle zentrifugiert wurde. Anschließend wurde
der Überstand, das heißt der Rohextrakt, abgenommen
und untersucht. Dieser Rohextrakt beinhaltet die

aus den Zellen freigesetzten Inhaltsstoffe und spiegelt somit die extrazelluläre Konzentration dieser Substanzen wieder.

Die DNA-Konzentration der Rohextrakte wurde in Microtiterplatten mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green I (Molecular Probes) über eine Geldokumentationsanlage bestimmt. Hierzu wurden 50 µl einer DNA-Eichreihe (0,3 bis 5 µg/ml) in wässriger Lösung beziehungsweise die jeweiligen Rohextrakte mit 200 µl 5000-fach in 10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA-Lösung, pH 7,5 verdünntem SYBR-Green I vermischt. Nach fünf Minuten wurde die Fluoreszenz der Proben bei Anregungen von 254 und 365 nm über die Pixeldichte bestimmt. Hierzu wurde das Programm Image Tool verwendet.

Die Proteinkonzentration der Rohextrakte wurde mit dem BioRad-Protein-Assay, der auf dem Proteinnachweis nach Bradford basiert, durchgeführt. Als Reagenzlösung wurde das BioRad-Proteinreagenz-Konzentrat, 5-fach mit Wasser verdünnt, eingesetzt. Die Proteinlösungen wurden mit der Reagenzlösung im Verhältnis 1:4 versetzt. Dies entspricht einer Micro-Assay-Testlösung. BSA wurde in Wasser gelöst und für die Probenlösung entsprechend verdünnt. Nach einer Inkubation bei Raumtemperatur von mindestens 10 Minuten wurde die Absorption der Proben bei einer Wellenlänge von 590 nm mit einem Microtiterplatten-Lesegerät bestimmt.

Die Trenneffizienz des erfindungsgemäßen Verfahrens wurde also durch Bestimmung der Protein- und DNA-Konzentration der Rohextrakte bestimmt. Der Wert

des jeweils niedrigsten variablen Parameters (Protein- beziehungsweise DNA-Konzentration) wurde jeweils gleich Null gesetzt und anhand der Maximalwerte das Verhältnis der prozentualen Werte von extrazellulären Proteinen und extrazellulärer DNA berechnet. Hierbei wurde das Verhältnis der Nullwerte gleich eins gesetzt. Dies entspricht der Anreicherung von Proteinen gegenüber DNA im flüssigen Medium außerhalb des biologischen Materials. Da bestimmte Proteine hauptsächlich aufgrund ihrer Größe durch kleine Poren von intrazellulären ins extrazelluläre Medium überreten, DNA, im speziellen genomische DNA, jedoch überwiegend nur bei komplett lysierten Zellen in das extrazelluläre Medium gelangt, gibt die Anreicherung auch den Grad des Zellaufschlusses wieder. Ein Zellaufschluss ist bei der erfindungsgemäßen Vorgehensweise aufgrund mangelnder Selektivität natürlich nicht erwünscht.

Gemäß des vorliegenden Beispieles wurde also eine Abtrennung des Proteins von der DNA angestrebt, das heißt, es ist eine Proteinanreicherung im außerhalb des biologischen Materials, das heißt der Zellen, befindlichen flüssigen Mediums erwünscht. Je höher der Anreicherungswert für extrazelluläres Protein, desto mehr Protein gelangte aus der Zelle in das umgebende Medium und desto mehr DNA verblieb in der Zelle, was gleichsam einen geringen Grad an Zellaufschluss widerspiegelt.

In den folgenden Ausführungsbeispielen wurde die Feldstärke, die Impulszahl (Iz) und damit sowohl die Behandlungsdauer (Bd) als auch die Frequenz

(Fr) variiert ($I_z = Bd \cdot Fr$). Außerdem wurde der Einfluß der Behandlungstemperatur dargelegt.

Die Figur 15 zeigt die Abhängigkeit der extrazellulären Protein-Anreicherung von der eingesetzten Feldstärke. Bei einer Impulszahl von 18000 bei einer Behandlungsdauer von 60 Minuten, einer Frequenz von 5 Hz und einer Temperatur von 25°C wurden Feldstärken von 10; 30; 40; 60 V/cm eingesetzt. Zum Erreichen der kritischen Spannung V_c wäre eine Feldstärke von ca. 7 kV/cm notwendig gewesen. Die eingesetzten Feldstärken lagen damit weit unterhalb der kritischen Spannung V_c . Insbesondere bei einer Feldstärke von 30 bis 50 V/cm wurde eine besonders gute Anreicherung von Protein im außerhalb des biologischen Materials befindlichen Medium erreicht. Dieser optimale Feldstärkebereich hängt jedoch auch von den Parametern, Impulszahl, Behandlungsdauer, Frequenz, Temperatur, Lösung und dem biologischen Material selbst ab.

Die Figuren 16 und 17 betreffen die Abhängigkeit der extrazellulären Proteinanreicherung von der Impulszahl. Da die Impulszahl das Produkt aus Behandlungsdauer und Frequenz darstellt, wurden zwei, in Figur 16 und 17 dargestellte Analysen durchgeführt.

In einem Ausführungsbeispiel (Figur 16) wurde bei konstanter Behandlungsdauer die Frequenz der Impulse variiert, wobei Impulszahlen von 900/9000/18000 und 90000; Frequenzen von 0,5/5/25 und 50 Hz; eine Behandlungsdauer von 30 Minuten; eine Feldstärke von 10 V/cm und eine Temperatur von 25°C eingesetzt wurden. Der Figur 16 kann entnommen werden, dass

bei diesen Bedingungen, insbesondere bei einer Impulszahl von 9000, eine besonders gute Anreicherung von Protein außerhalb des biologischen Materials im flüssigen Medium erreicht werden konnte.

In der Figur 17 wurde bei konstanter Frequenz die Behandlungsdauer variiert, wobei Impulszahlen von 1500/9000/18000; Behandlungsdauern von 5/30 und 60 Minuten; eine Frequenz von 5 Hz; eine Feldstärke von 40 V/cm und eine Temperatur von 25°C eingesetzt wurden.

Aus den Figuren 16 und 17 wird deutlich, dass die extrazelluläre Anreicherung von Protein gegenüber DNA und damit die Trenneigenschaften des erfindungsgemäßen *in situ*-Trennverfahrens einen Bereich optimaler Impulszahlen von 5000 bis 12000 besitzt. Dieser Bereich ist jedoch auch von den Parametern Feldstärken, Behandlungsdauer, Frequenz, Temperatur, Lösung und dem biologischen Material selbst abhängig.

Die Figur 18 stellt die Abhängigkeit der extrazellulären Anreicherung von Protein gegenüber DNA bei konstanter Impulszahl in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer dar. Es wurden Behandlungsdauern von 0/3,3/6,7/33,3 und 66,7 Minuten; Frequenzen von 0/2,5/5/25 und 50 Hz; eine Impulszahl von 10000; eine Feldstärke von 40 V/cm sowie eine Temperatur von 25°C gewählt. Bei den gewählten Bedingungen waren insbesondere Behandlungsdauern bis zu 10 Minuten günstig, um eine Anreicherung von Proteinen gegenüber DNA zu erreichen. Direkte Effekte der Frequenz bezüglich der Induktion von Poren machen sich erst

in Frequenzgrößenordnungen bemerkbar, die Einfluss auf die Impulsform haben. Eine erhöhte Frequenz in den vorliegenden Ausführungsbeispielen hatte bei der verwendeten Apparatur lediglich Auswirkungen auf die maximal erreichbare Feldstärke. Deshalb ist die in Figur 18 dargestellte Abhängigkeit der Anreicherung von Proteinen bei konstanter Impulszahl und damit variabler Frequenz sowie Behandlungsdauer auf die Behandlungsdauer zurückzuführen. Die Daten sind somit mit der Abhängigkeit der Anreicherung von der Impulszahl bei konstanter Frequenz zu korrelieren (vergleiche Figur 17).

Die Figur 19 verdeutlicht die Trenneigenschaften des vorliegenden Verfahrens in Abhängigkeit von der Temperatur. In diesem Ausführungsbeispiel wurden die Parameter wie folgt gewählt: Temperatur 10/30/45/55/50/65°C, Feldstärke 24 V/cm; Impulszahl 18000, Behandlungsdauer 6 Minuten und Frequenz 50 Hz.

Das Optimum der Temperatur für die beispielhaft untersuchte Trennung von Proteinen und DNA liegt mit ca. 50°C deutlich über den ambienten Temperaturen, die bei einer Elektroporation von *E. coli* verwendet werden würden. Der Aufschluss der Zellen wäre in diesem System vorzugsweise bei Temperaturen über 70°C durchzuführen. Das Temperaturoptimum der erfundungsgemäßen *in situ*-Trennverfahren hängt auch von den Parametern Feldstärke, Impulszahl, Frequenz, Behandlungsdauer, Lösung und biologischem Material selbst ab.

Aus den vorliegenden Daten wird deutlich, dass Stoffe, insbesondere nach dem Prinzip eines Molekularsiebes, das heißt nach ihrer Größe, getrennt werden. Stoffe, deren Größe keinen Durchtritt durch die erfindungsgemäß induzierten Poren ermöglicht, werden zurückgehalten. Kleinere niedermolekulare Stoffe hingegen gelangen durch die Poren in das außerhalb des biologischen Materials befindliche Medium.

Ansprüche

1. Verfahren zur selektiven Anreicherung oder Trennung eines oder mehrerer Stoffe aus einem in einem flüssigen Medium befindlichen Stoffgemisch in situ mittels einer stationären und einer mobilen Phase, wobei die stationäre Phase Bestandteil eines biologischen Materials und die mobile Phase ein flüssiges Medium ist und wobei das in dem flüssigen Medium befindliche biologische Material gepulst, elektrischen Feldern mit einer Feldstärke bis 200 V/cm ausgesetzt wird.
2. Verfahren zur Desintegration von biologischem Material in einem Probenträgersystem, umfassend mindestens ein nicht-leitendes Element sowie zwei leitende Elemente, wobei an die leitenden Elemente eine Spannung angelegt wird und das biologische Material einem elektrischen Feld mit einer Feldstärke bis 200 V/cm ausgesetzt wird.
3. Das Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das elektrische Feld gepulst ist.
4. Das Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das elektrische Feld homogen oder inhomogen ist.
5. Das Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei eine elektrische Feldliniendichte lokal erhöht ist.

6. Das Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das elektrische Feld verschiedene Impulsformen aufweist.
7. Das Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Anzahl elektrischer Impulse über zehn liegt.
8. Das Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die elektrische Spannung des einzelnen Impulses in sich schwankt.
9. Das Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Impuls ein Gleichspannungs-Impuls und/oder ein Wechselspannungs-Impuls ist.
10. Das Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das elektrische Feld exponentielle, sinusförmige Impulsformen, Rechtecksimpulse und/oder Dreiecksimpulse aufweist.
11. Das Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei ein Drehstrom, insbesondere ein 3-Phasendrehstrom, verwendet wird.
12. Das Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Impulszahl der gepulsten elektrischen Felder mindestens 15, vorzugsweise 15 bis 19000, insbesondere 5000 bis 12000, beträgt.
13. Das Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Feldstärke der Impulse unterhalb

der kritischen Spannung V_c über der Membran des biologischen Materials liegt.

14. Das Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Feldstärke der Impulse bei 30 bis 50 V/cm liegt.

15. Das Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Temperatur bei der biologischen Desintegration bei 0 bis 100°C, insbesondere 20 bis 80°C, liegt.

16. Das Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Temperatur bei der chromatographischen Auftrennung bei -30°C bis +90°C, insbesondere 50 bis 55°C, liegt.

17. Das Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Behandlungsdauer 2 Sekunden bis 5 Stunden beträgt.

18. Das Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Frequenz der Impulse 0,01 Hz bis 40 GHz beträgt.

19. Das Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Impulsdauer 25 ps bis 50 min, insbesondere 15 µs, beträgt.

20. Das Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei während und/oder nach der Behandlung mit dem elektrischen Feld ein oder mehrere Stoffe aus dem biologischen Material freigesetzt werden.

21. Das Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei während und/oder nach der Behandlung mit den gepulsten elektrischen Feldern ein oder mehrere Stoffe aus dem biologischen Material freigesetzt, im flüssigen Medium außerhalb des biologischen Materials angereichert und anschließend vom biologischen Material abgetrennt werden.
22. Das Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der oder die Stoffe durch Zentrifugation des biologischen Materials und des flüssigen Mediums von dem biologischen Material abgetrennt werden.
23. Das Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der oder die Stoffe durch Filtration von dem biologischen Material abgetrennt werden.
24. Das Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei während und/oder nach der Behandlung mit den gepulsten elektrischen Feldern ein oder mehrere Stoffe im biologischen Material angereichert und dabei dem flüssigen Medium außerhalb des biologischen Materials entzogen werden und anschließend das flüssige Medium von dem biologischen Material abgetrennt wird.
25. Das Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Stoff eine Nucleinsäure, insbesondere DNA oder RNA, oder ein Derivat derselben ist.
26. Das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei der Stoff ein Protein, ein Peptid, ein Koh-

lenhydrat, ein Lipid, ein Farbstoff, ein Metabolit oder ein Derivat und/oder eine Kombination derselben ist.

27. Das Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das biologische Material Organismen, Organe, Gewebe, Organellen, membranumschlossene Kompartimente wie Zellen, insbesondere menschliche, tierische, pflanzliche, Hefe- oder bakterielle Zellen, Viren, Zellkerne, Plastiden, Mitochondrien, Micellen und/oder Liposomen sind.

28. Das Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das biologische Material in einer Lösung und/oder auf einer Matrix vorliegt.

29. Das Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Lösung eine hohe Leitfähigkeit aufweist.

30. Das Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Matrix in direktem Kontakt zu einem leitenden Element (57) steht oder über eine Flüssigkeitszone von dem leitenden Element (57) getrennt ist.

31. Das Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das biologische Material mit dem leitenden Element (57) in Kontakt steht.

32. Das Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die elektrische Trennung und/oder Desintegration in Gegenwart von Chemikalien durchgeführt wird.

33. Das Verfahren nach Anspruch 32, wobei die Chemikalien vor oder nach der erfolgten elektrischen Trennung und/oder Desintegration zugegeben werden.
34. Das Verfahren nach Anspruch 32 und 33, wobei die Chemikalien chaotrope Salze, Detergenzien, Enzyme und/oder fluiditätsmodulierende, lytische, Protease-hemmende und/oder Nuclease-hemmende Chemikalien sind.
35. Probenträgersystem (31), umfassend mindestens ein nicht-leitendes Element (59) sowie mindestens zwei leitende Elemente (57), insbesondere Elektroden (11).
36. Vorrichtung nach Anspruch 35, umfassend mindestens ein als Aufnahmemittel ausgeführtes nicht-leitendes Element (59) und mindestens ein als Abdeckung (35) ausgeführtes leitendes Element (57).
37. Vorrichtung nach Anspruch 36, wobei die Abdeckung (35) Fortsätze und/oder Vorsprünge (77) umfasst.
38. Vorrichtung nach Anspruch 37, wobei die Fortsätze oder die Vorsprünge (77) mit dem Aufnahmemittel (60) wirkverbindbar angeordnet sind.
39. Vorrichtung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, umfassend mindestens ein als Aufnahmemittel (60) ausgeführtes leitendes Element (57).

- 60 -

40. Vorrichtung nach Anspruch 39, wobei das Aufnahmemittel mindestens ein als Abdeckung (35) ausgeführtes leitendes Element (57) umfasst.
41. Vorrichtung nach Anspruch 40, wobei die Abdeckung Fortsätze und/oder Vorsprünge (77) umfasst.
42. Vorrichtung nach Anspruch 41, wobei die Fortsätze und/oder die Vorsprünge (77) mit dem Aufnahmemittel (60) wirkverbindbar angeordnet sind.
43. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 35 bis 42, wobei die Elektroden (11) aus Aluminium, Gold, Platin, Silber, Gold oder Kohle bestehen oder diese einzeln oder in Kombination enthalten.
44. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 35 bis 43, wobei die nicht leitenden Elemente (59) aus Kunststoff, Glas oder Silicium bestehen oder diese einzeln oder in Kombination enthalten.
45. In situ-Trennvorrichtung (12), umfassend ein Gehäuse aus einer Bodenplatte (14), einer Deckplatte (13), zwei Seitenwänden (28,29) sowie zwei als Seitenwände ausgeführten Elektroden (11), wobei in der Deckplatte (13) zumindest eine Öffnung (15) vorhanden ist.
46. Vorrichtung nach Anspruch 45, wobei die Elektroden (11) aus Aluminium, Edelstahl, Platin, Silber, Gold oder Kohle bestehen oder diese einzeln oder in Kombination enthalten.

- 61 -

47. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 45 und 46, wobei in der Deckplatte (13) zwei Öffnungen (20,21) vorhanden sind.

48. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 45 bis 47, wobei in der Bodenplatte (14) eine Öffnung (22) vorhanden ist.

49. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 45 bis 48, wobei in einer oder mehreren der Öffnungen (15,20,21,22) Filter (23,26) vorhanden sind.

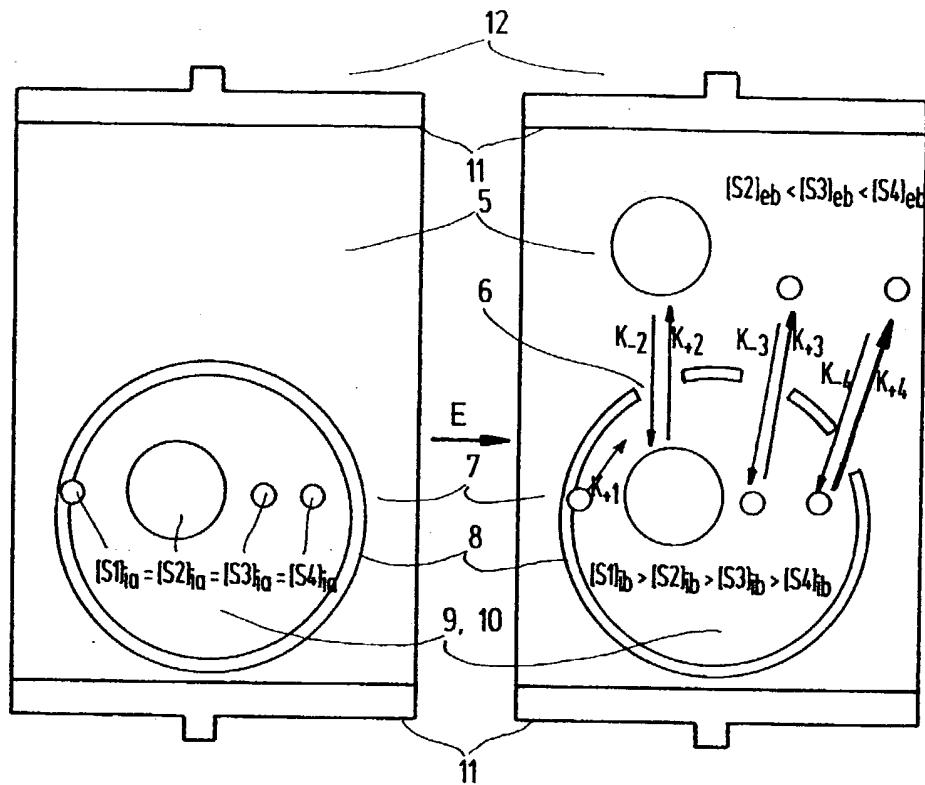


Fig.1

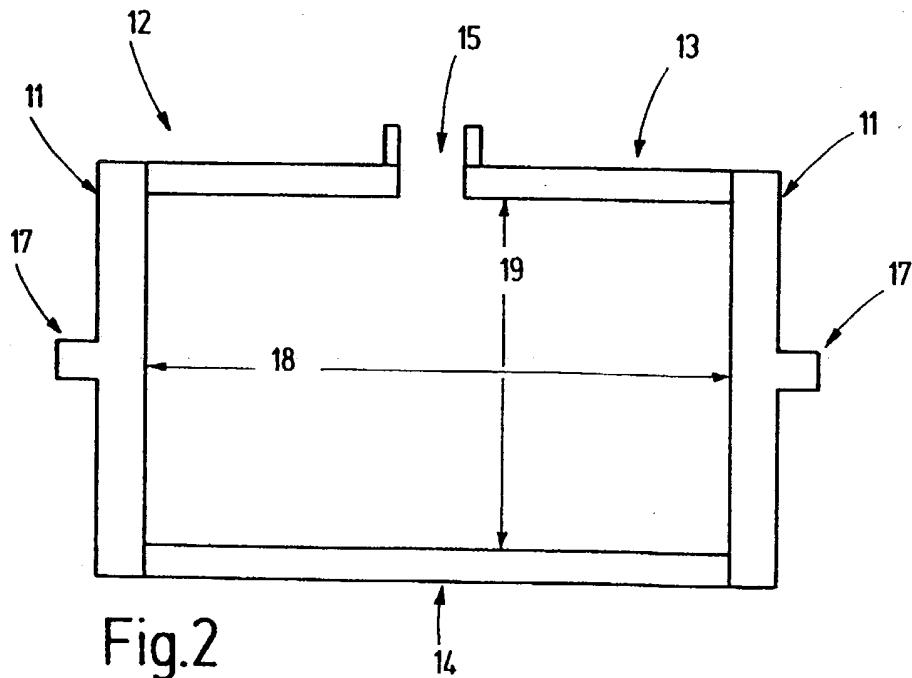


Fig.2

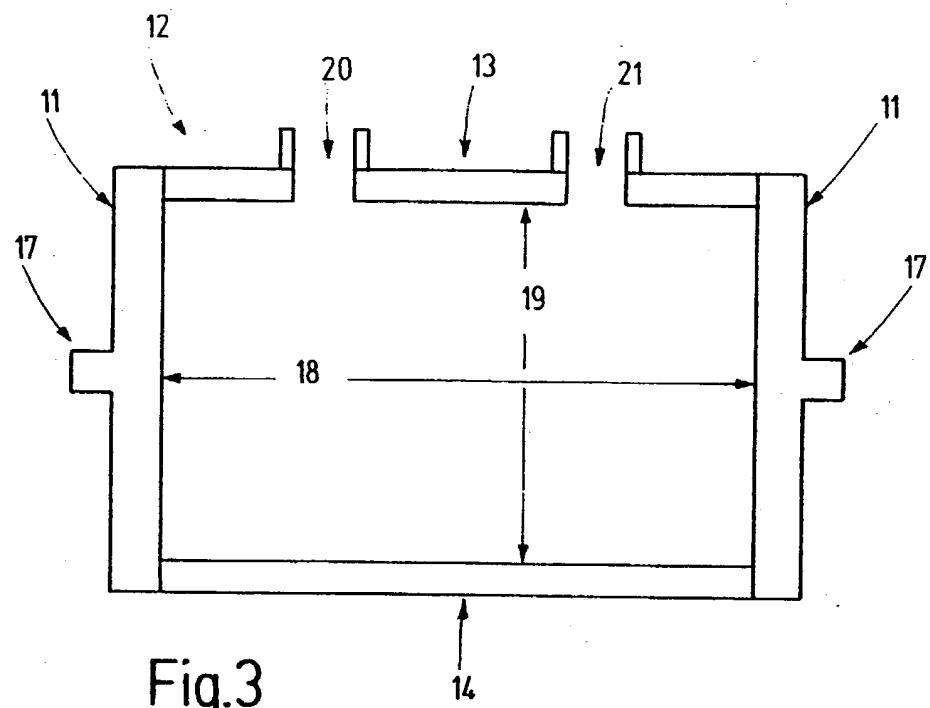


Fig.3

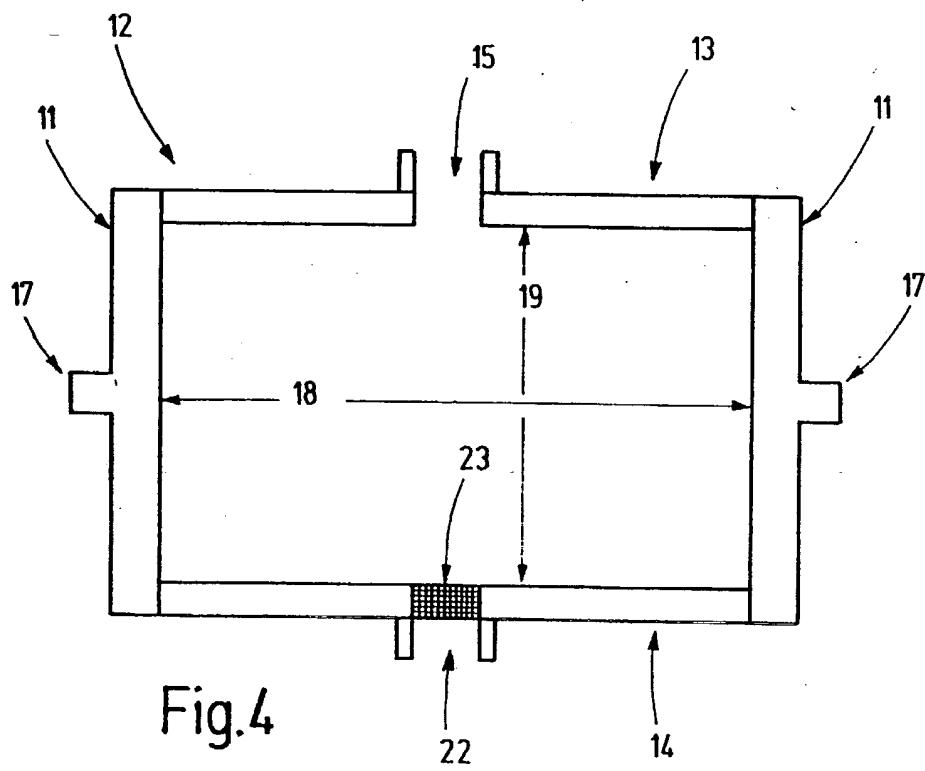
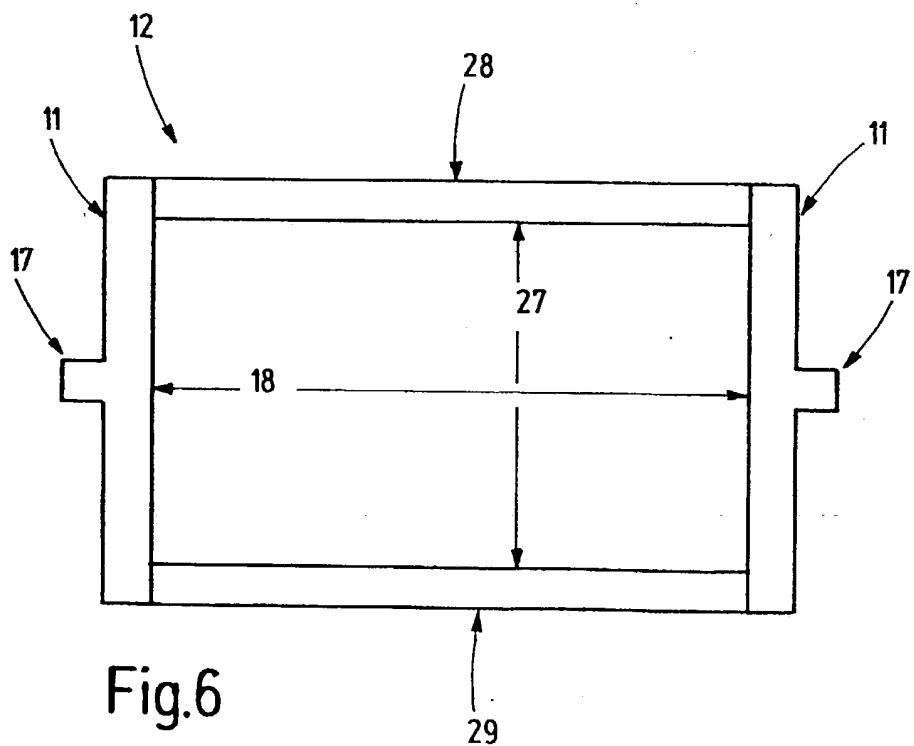
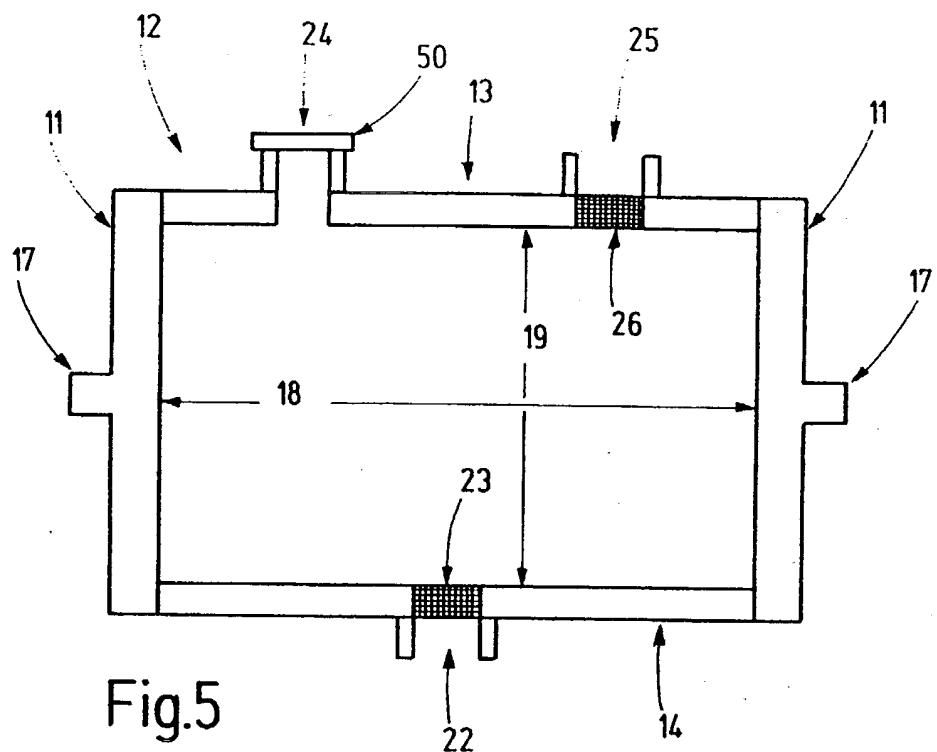
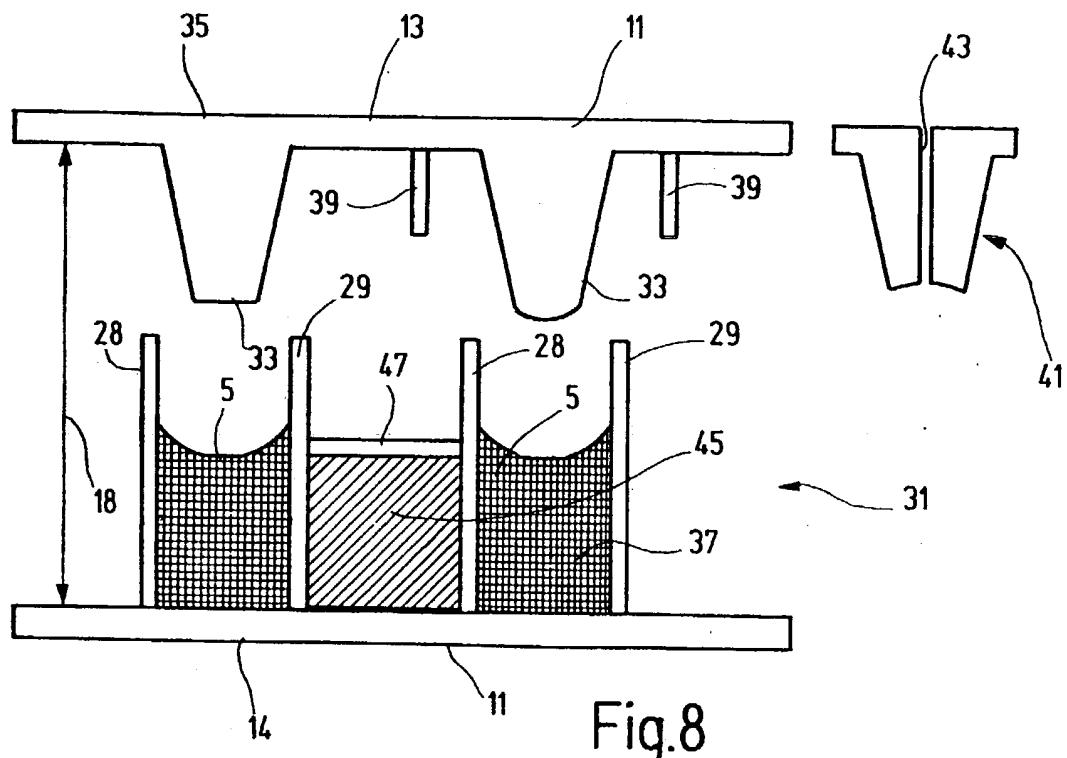
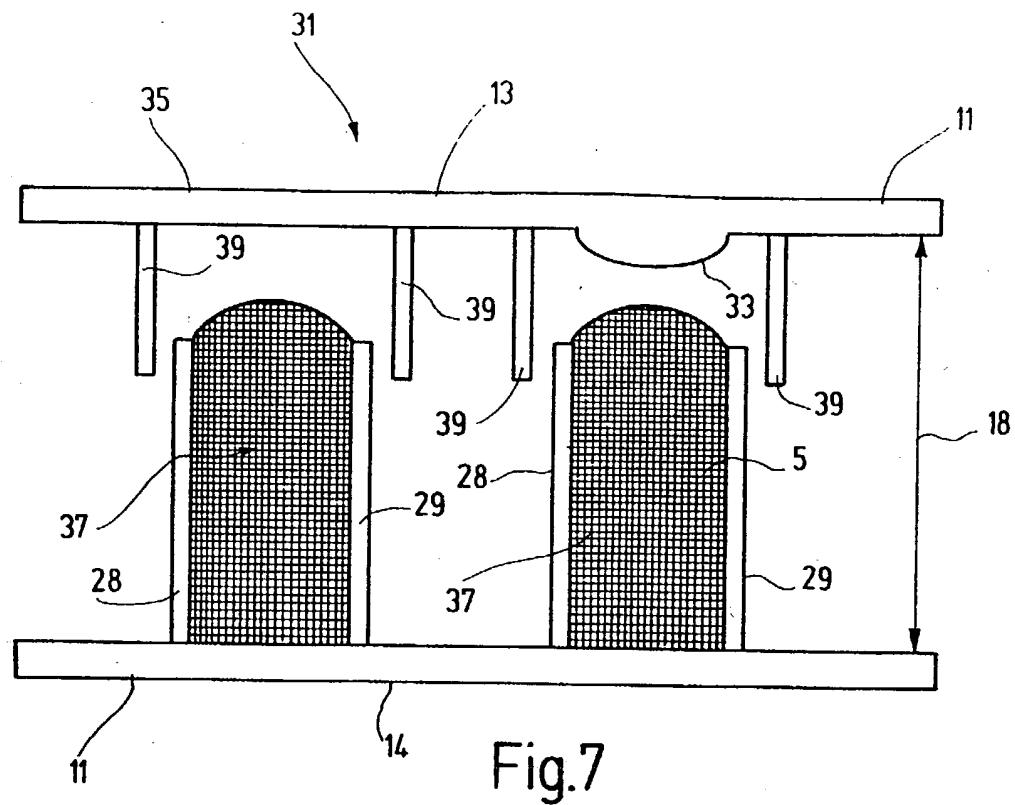


Fig.4



4 / 10



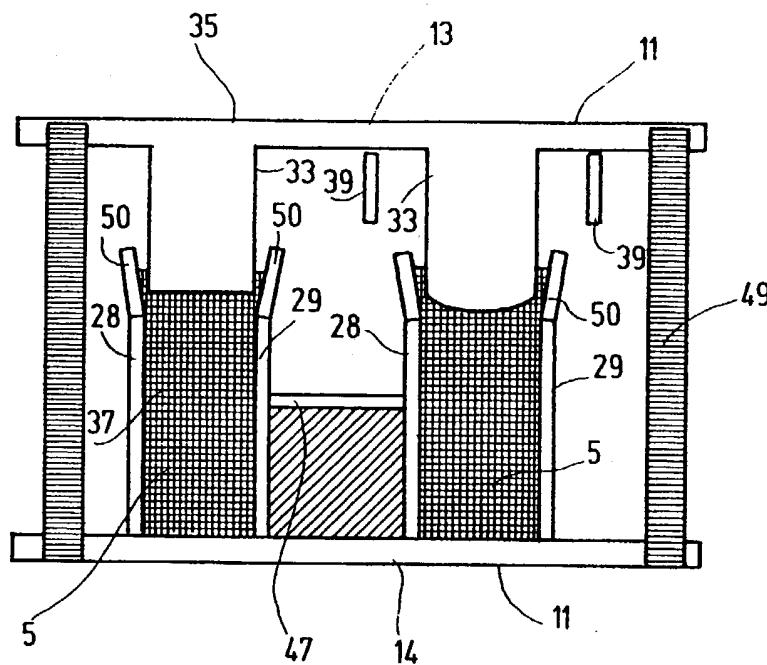


Fig.9a

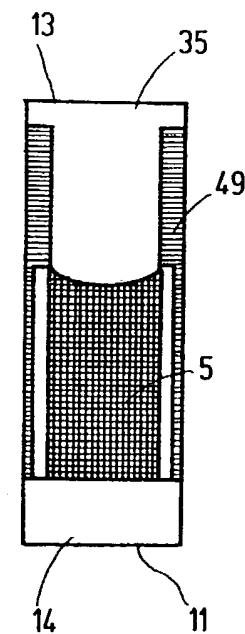


Fig.9b

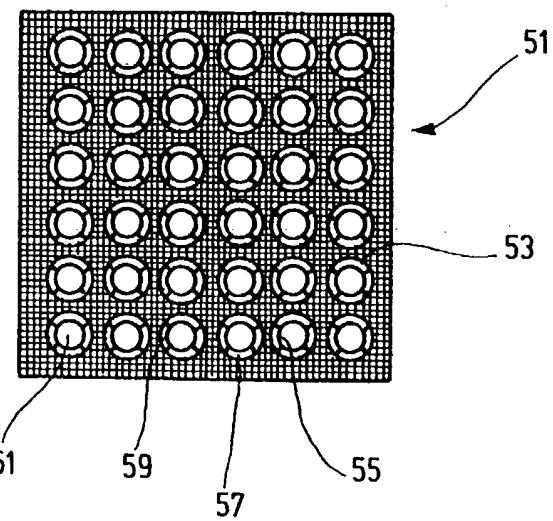


Fig.10

6 / 10

Fig.11

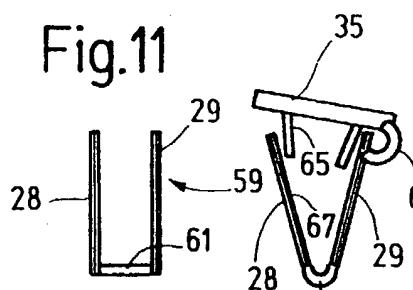


Fig.11a

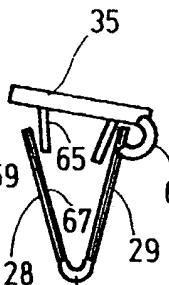


Fig.11b

Fig.12

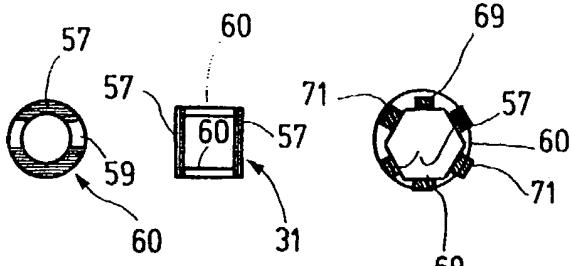


Fig.12a

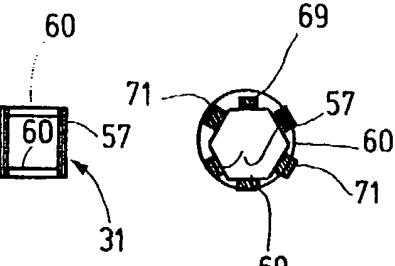


Fig.12b

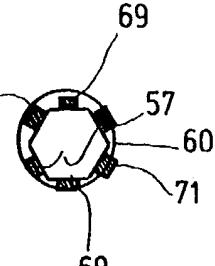


Fig.12c

Fig.13

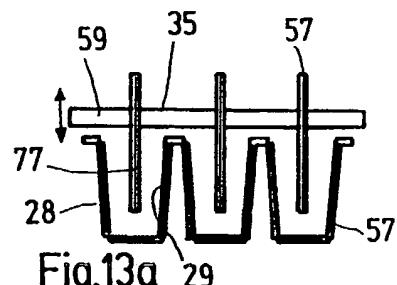


Fig.13a

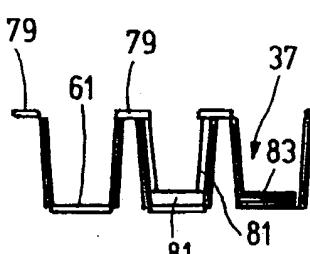


Fig.13b

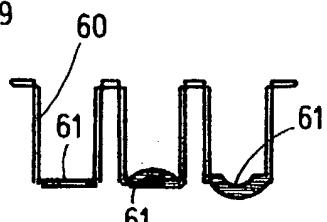


Fig.13c

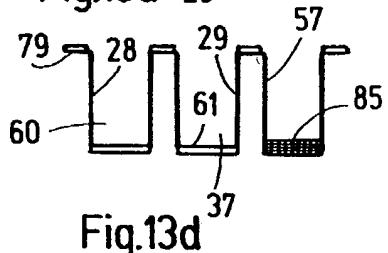


Fig.13d

Fig.14

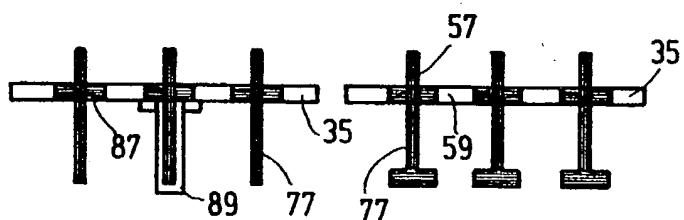


Fig.14a

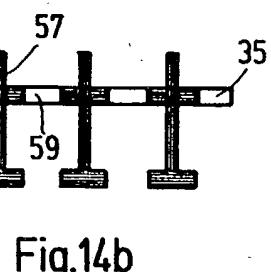


Fig.14b

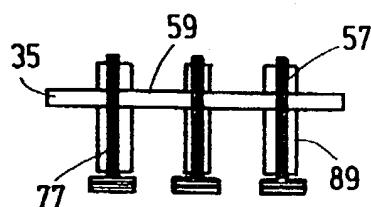


Fig.14c

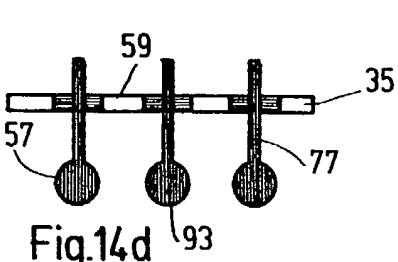


Fig.14d

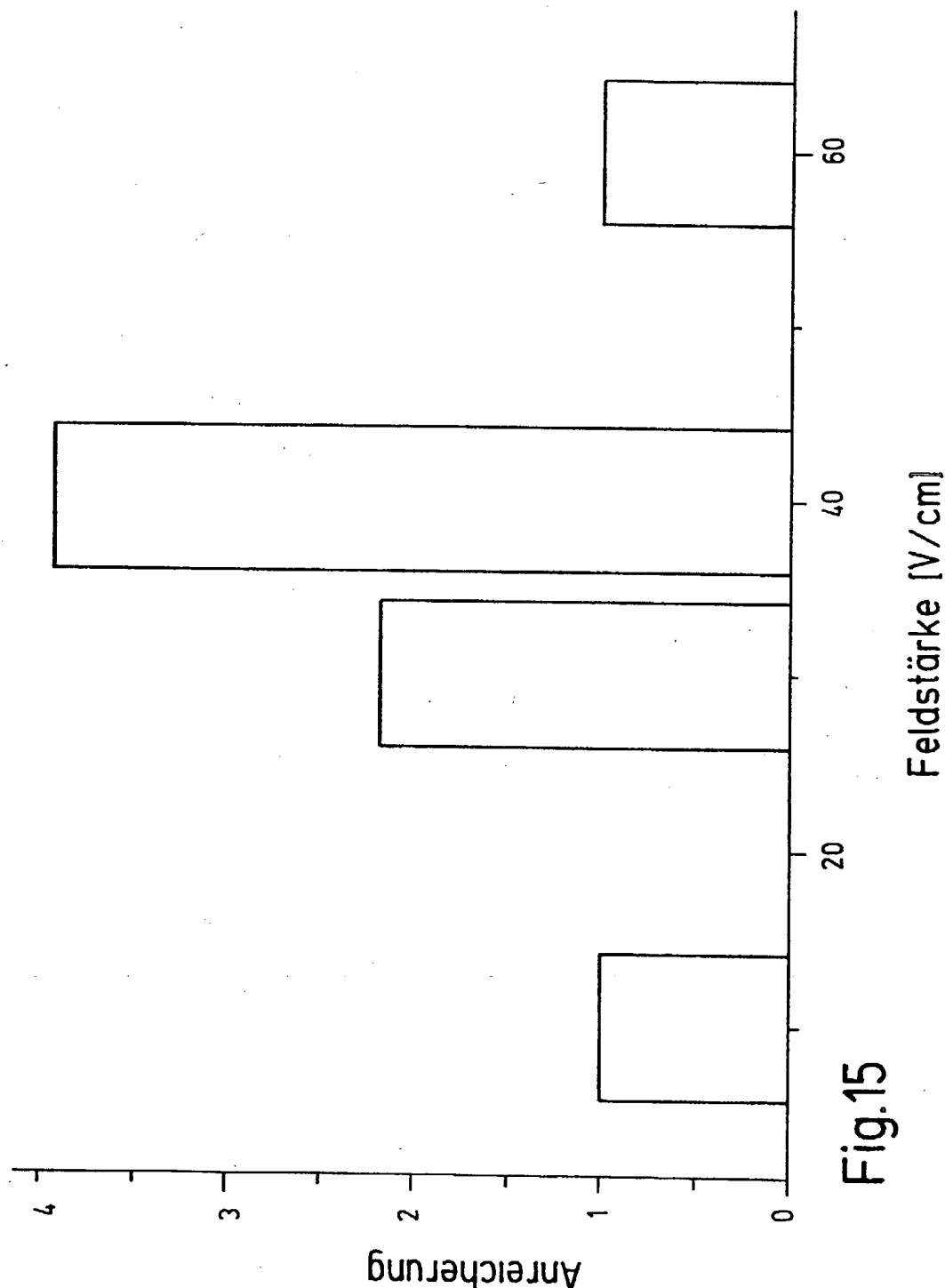


Fig.15

8 / 10

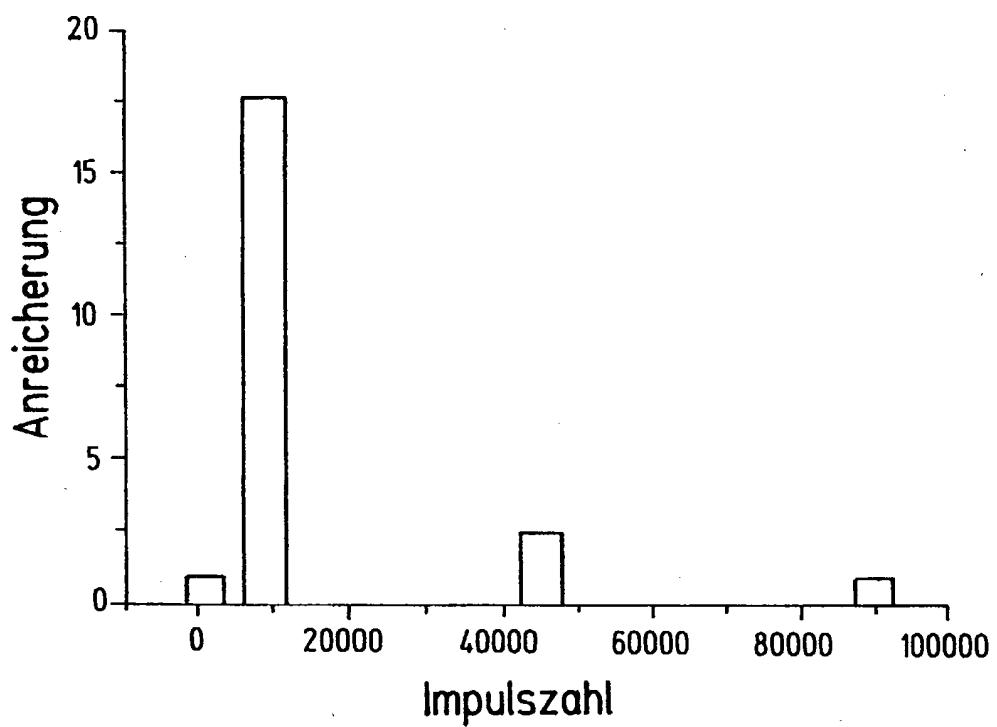


Fig.16

9 / 10

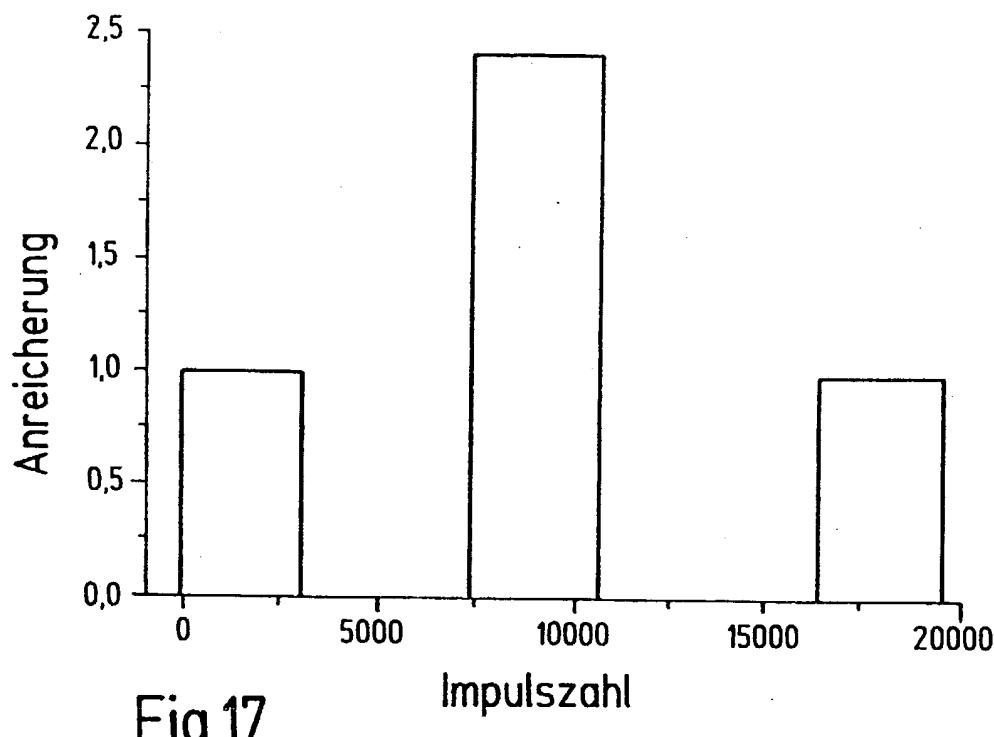


Fig.17

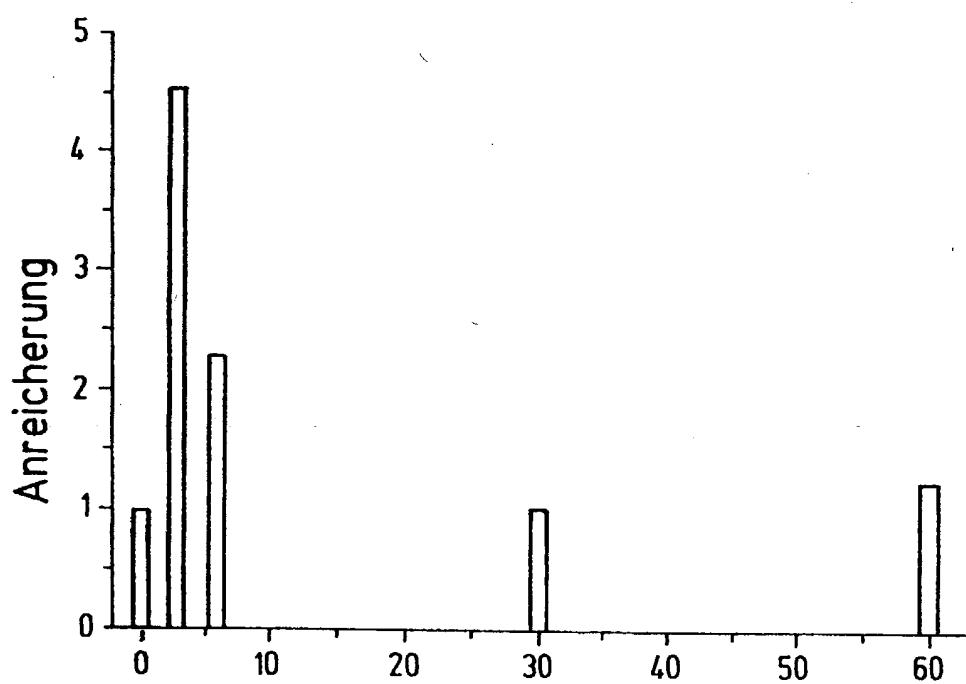


Fig.18 Behandlungsdauer [min]

10 / 10

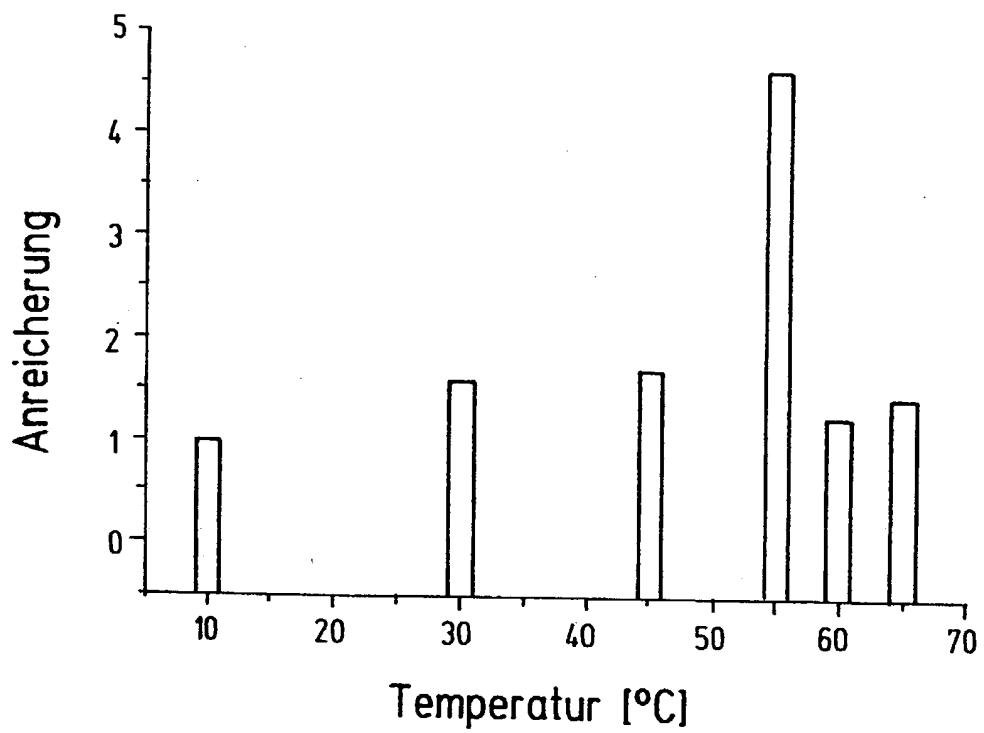


Fig.19